

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4951527号
(P4951527)

(45) 発行日 平成24年6月13日(2012.6.13)

(24) 登録日 平成24年3月16日(2012.3.16)

(51) Int. Cl.	F 1
C 07 K 14/535	(2006.01) C 07 K 14/535 Z N A
C 12 P 21/02	(2006.01) C 12 P 21/02 K
A 61 K 38/00	(2006.01) A 61 K 37/02
A 61 P 43/00	(2006.01) A 61 P 43/00 105
A 61 P 31/00	(2006.01) A 61 P 31/00

請求項の数 35 (全 103 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2007-550570 (P2007-550570)
(86) (22) 出願日	平成18年1月10日 (2006.1.10)
(65) 公表番号	特表2009-501127 (P2009-501127A)
(43) 公表日	平成21年1月15日 (2009.1.15)
(86) 國際出願番号	PCT/US2006/000870
(87) 國際公開番号	W02006/074467
(87) 國際公開日	平成18年7月13日 (2006.7.13)
審査請求日	平成21年1月8日 (2009.1.8)
(31) 優先権主張番号	60/643, 437
(32) 優先日	平成17年1月10日 (2005.1.10)
(33) 優先権主張国	米国(US)
(31) 優先権主張番号	60/665, 588
(32) 優先日	平成17年3月25日 (2005.3.25)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	509115384 バイオジエネリックス アーゲー ドイツ国, マンハイム 68199, ヤン デルシュトラッセ 3
(74) 代理人	100079108 弁理士 稲葉 良幸
(74) 代理人	100109346 弁理士 大貫 敏史
(72) 発明者	デフリース, ショーン アメリカ合衆国, ペンシルバニア州 19 454, ノース ウェールズ, フィリー ドライブ 126
(72) 発明者	クロウゼン, ヘンリック デンマーク国, ディーケー-2840 ホ ルテ, ソエブリンクエン 6

最終頁に続く

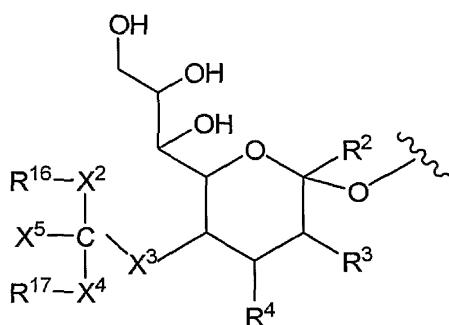
(54) 【発明の名称】 糖PEG化顆粒球コロニー刺激因子

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

顆粒球コロニー刺激因子ペプチドであって、前記ペプチドのアミノ酸残基に結合したグリコシル連結基を含んで成り、前記グリコシル連結基が、式

【化 1】



10

[式中、

R² は H、 C H₂ O R⁷、 COO R⁷、 または O R⁷ であり、
ここで

R⁷ は、 H、 置換もしくは非置換アルキル、 または 置換もしくは非置換ヘテロアル

20

キルであり、

R^3 および R^4 は、H、置換もしくは非置換アルキル、 OR^8 、 $NHC(O)R^9$ から独立して選択されるメンバーであり、

ここで

R^8 および R^9 は、H、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、またはシアル酸から独立して選択され、

X^3 は、 S 、 $SC(O)NH$ 、 $HNC(O)S$ 、 $SC(O)O$ 、 O 、 NH 、 $NHC(O)$ 、 $(O)CNH$ 、 $NHC(O)O$ 、 $OC(O)NH$ 、 CH_2S 、 CH_2O 、 CH_2CH_2O 、 CH_2CH_2S 、 $(CH_2)_nO$ 、 $(CH_2)_nS$ 、および $(CH_2)_nY'$ - PEG から選択されるリンクエージ断片であり、ここで Y' は S 、 NH 、 $NHC(O)$ 、 $C(O)NH$ 、 $NHC(O)O$ 、 $OC(O)NH$ 、または O であり、 n は 1 ~ 50 の整数であり、

R^{1-6} および R^{1-7} は、ポリマー腕から独立して選択され、

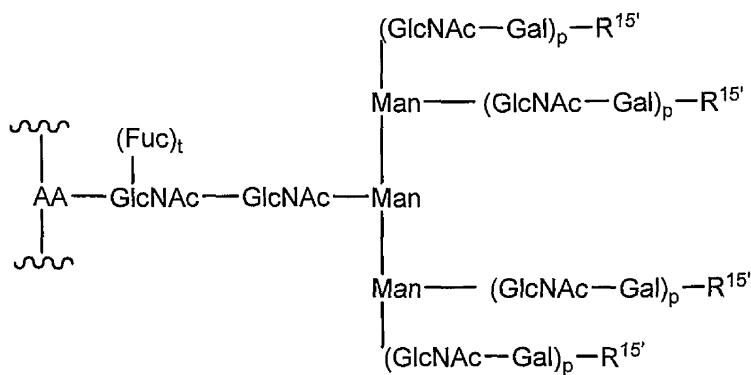
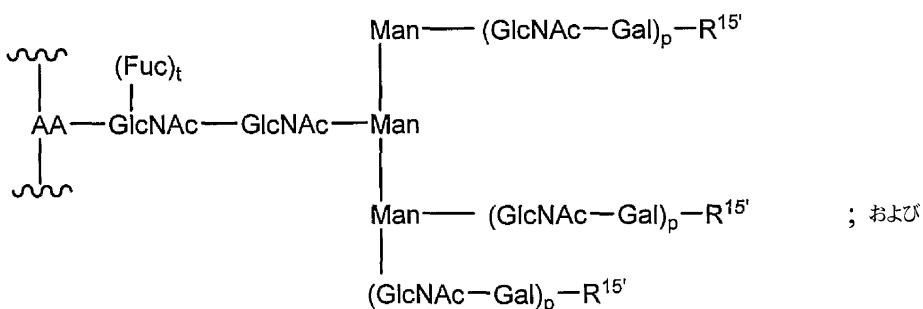
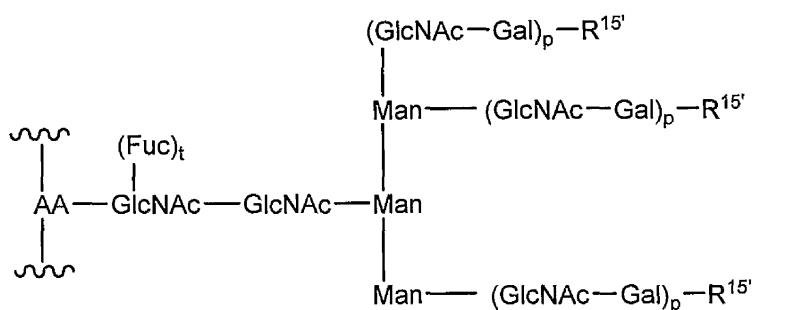
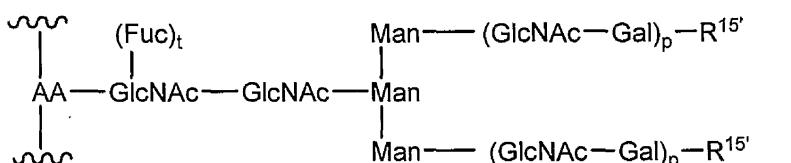
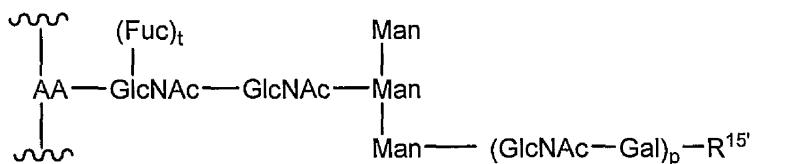
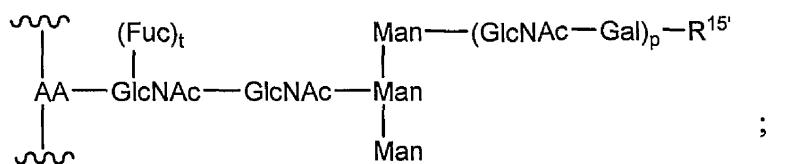
X^2 および X^4 は、ポリマー部分 R^{1-6} および R^{1-7} を C に結合する独立して選択されるリンクエージ断片であり、

X^5 は非反応基である]

を有する修飾シアリル残基を含んで成り、

前記グリコシル連結基が、

【化 2】



およびその組合せから選択される式

【式中、

A A は前記ペプチドの前記アミノ酸残基であり、

t は 0 または 1 に等しい整数であり、

p は 1 ~ 10 の整数であり、

R^{1~5} は、H、OH、シアル酸、前記修飾シアリル残基、および Sia - Sia^p から選択されるメンバーであり、

ここで、

Sia^p は前記修飾シアリル残基であり、

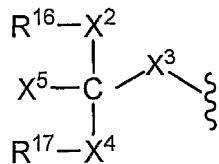
ここで少なくとも 1 つの R^{1~5} が前記修飾シアリル残基および Sia - Sia^p から選択される】

を有する、顆粒球コロニー刺激因子ペプチド。

【請求項 2】

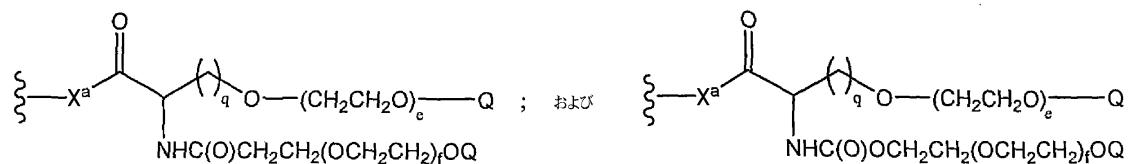
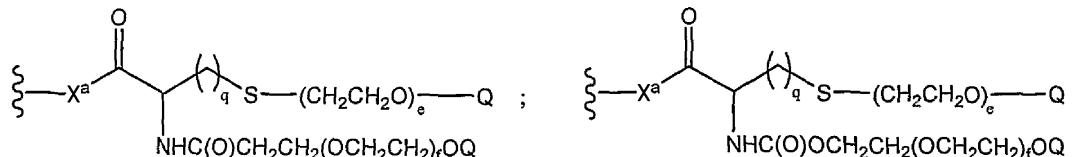
部分

【化 3】



が、

【化 4】



【式中、

X^a は NH であり、

Q は、H、および置換もしくは非置換 C₁ - C₆ アルキルから選択され、

e および f は、1 ~ 2500 から独立して選択される整数であり、かつ

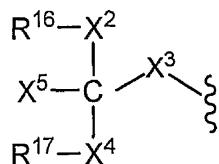
q は、0 ~ 20 の整数である】

から選択されるメンバーである式を有する請求項 1 に記載のペプチド。

【請求項 3】

部分

【化 5】



が、

10

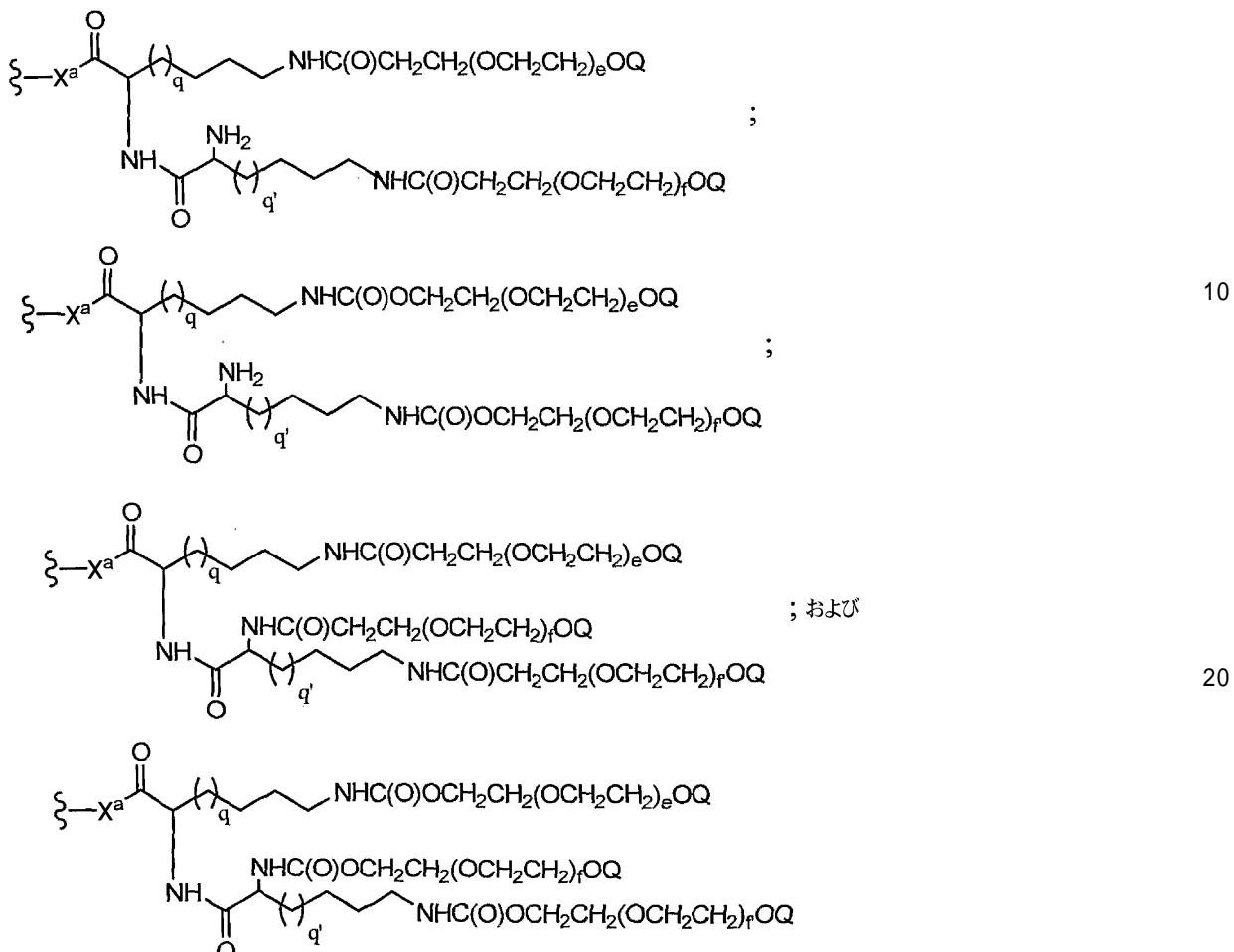
20

30

40

50

【化6】



[式中、

X^a は NH であり、

30

Q は、H、および置換もしくは非置換 C₁ - C₆ アルキルから選択され、

e、f および f' は、1 ~ 2500 から独立して選択される整数であり、かつ

q および q' は、1 ~ 20 から独立して選択される整数である]

から選択されるメンバーである式を有する、請求項1に記載のペプチド。

【請求項4】

前記アミノ酸残基がセリンまたはトレオニンから選択されるメンバーである、請求項1に記載のG-CSFペプチド。

【請求項5】

前記ペプチドが、配列番号1のアミノ酸配列を有する、請求項1に記載のG-CSFペプチド。

40

【請求項6】

前記アミノ酸残基が、配列番号1の位置133でトレオニンである、請求項5に記載のG-CSFペプチド。

【請求項7】

前記アミノ酸残基がアスパラギン残基である、請求項1に記載のペプチド。

【請求項8】

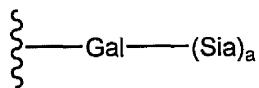
前記ペプチドが生物活性顆粒球コロニー刺激因子ペプチドである、請求項1に記載のペプチド。

【請求項9】

(a) グリコシル部分

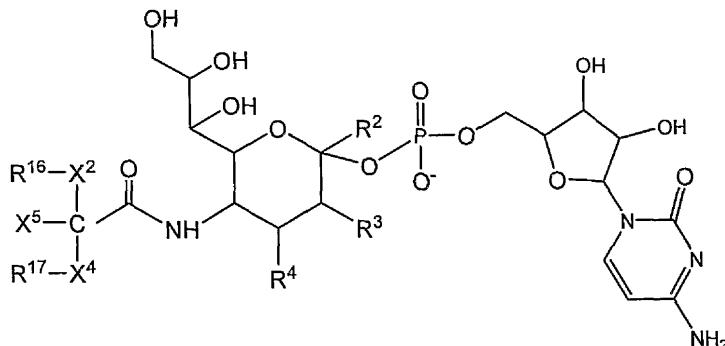
50

【化7】



を含んで成る基質顆粒球コロニー刺激因子ペプチドを、式

【化8】



10

20

[式中、aは0または1である]

を有するPEG-シアル酸ドナーと接触させるステップと、

(b)ステップ(a)からの生成物を、前記ドナーから前記グリコシル部分のGalまたはSiaへPEG-シアル酸を移動させる酵素と、前記移動に適切な条件下に接触させるステップと

を含んで成る、請求項1に記載のペプチドを調製する方法。

【請求項10】

ステップ(a)の前に、

(b)適切な宿主において前記基質顆粒球コロニー刺激因子ペプチドを発現させるステップ

30

をさらに含んで成る、請求項9に記載の方法。

【請求項11】

前記宿主が昆虫細胞および哺乳類細胞から選択される、請求項10に記載の方法。

【請求項12】

前記昆虫細胞がスpodoptera・フルギペルタ(Spodoptera frugiperda)細胞系である、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

哺乳類に投与して、前記哺乳類における炎症性白血球産生を刺激するための医薬製剤を製造するための、請求項1に記載のペプチドの使用。

【請求項14】

対象に投与して、それを必要とする前記対象における感染を治療するための医薬製剤を製造するための、前記対象における状態を緩和するために有効な量の請求項1に記載のペプチドの使用。

40

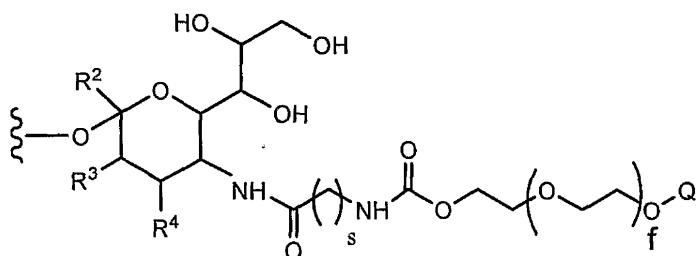
【請求項15】

請求項1に記載の顆粒球コロニー刺激因子ペプチド、および医薬的に許容される担体を含んで成る医薬製剤。

【請求項16】

顆粒球コロニー刺激因子ペプチドであって、前記ペプチドのアミノ酸残基に結合したグリコシル連結基を含んで成り、前記グリコシル連結基が、式

【化9】



10

[式中、

R² は H、C₁~C₆OR⁷、COOR⁷、COO⁻ または OR⁷ であり、
ここで

R⁷ は、H、置換もしくは非置換アルキル、または置換もしくは非置換ヘテロアルキルであり、

R³ および R⁴ は、H、置換もしくは非置換アルキル、OR⁸、NHCO(OR⁹)₂ から独立して選択されるメンバーであり、

ここで

R⁸ および R⁹ は、H、置換もしくは非置換アルキル、または置換もしくは非置換ヘテロアルキル、またはシアル酸から独立して選択され、

20

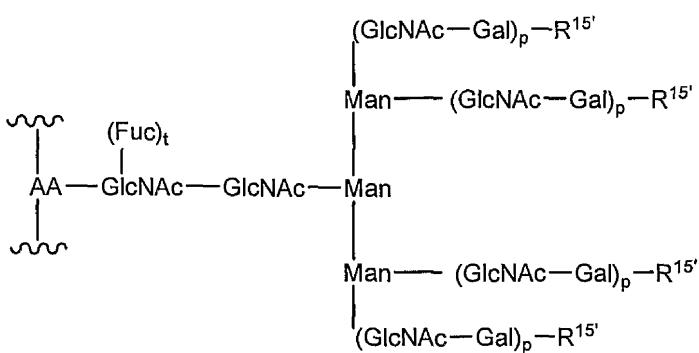
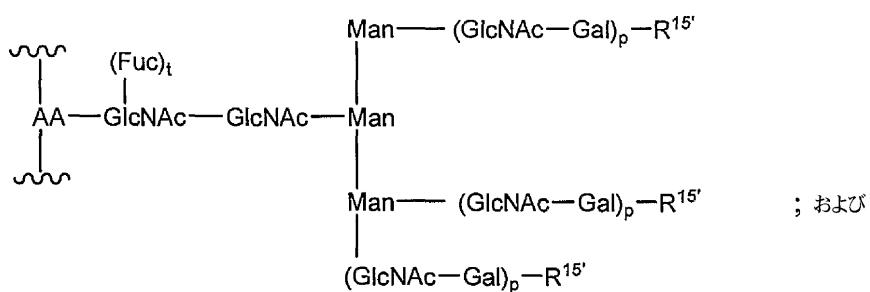
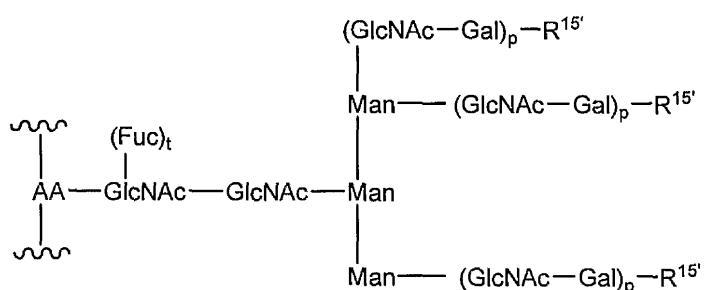
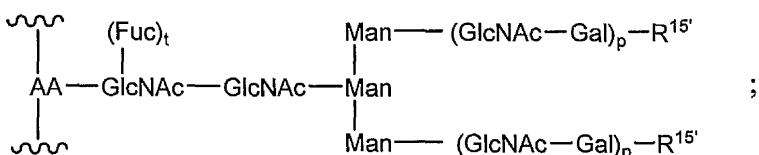
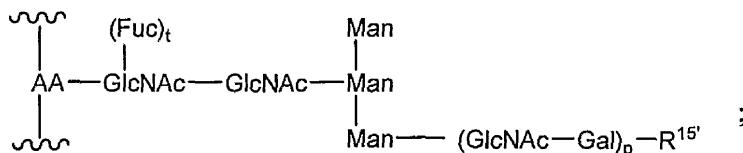
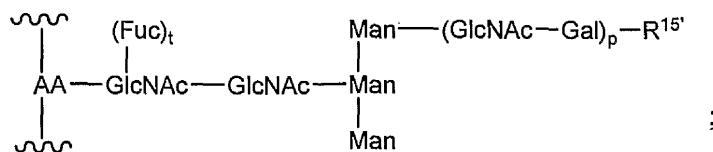
s は 1 ~ 20 の整数であり、

f は 1 ~ 2500 の整数であり、かつ

Q は H および置換もしくは非置換 C₁~C₆ アルキルから選択されるメンバーである]
を有する修飾シアリル残基を含んで成り、

前記グリコシル連結基が、

【化 1 0 】



およびその組合せから選択される式

[式中、

AAは前記ペプチドの前記アミノ酸残基であり、

t は 0 または 1 に等しい整数であり、

p は 1 ~ 10 の整数であり、
R^{1~5} は、 H、 OH、 シアル酸、 前記修飾シアリル残基、 および Sia - Sia^p から選択されるメンバーであり、

ここで、

Sia^p は前記修飾シアリル残基であり、

ここで少なくとも 1 つの $R^{1-5'}$ が前記修飾シアリル残基および $Sia-Sia^p$ から選択される]

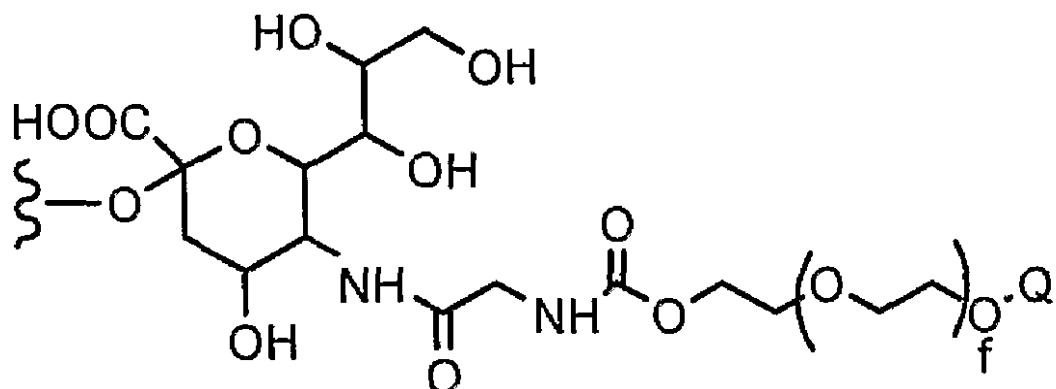
を有する、 顆粒球コロニー刺激因子ペプチド。

【請求項 17】

前記修飾シアリル残基が式

【化 1 1】

10



20

を有する、請求項 1 6 に記載のペプチド。

【請求項 18】

Q が H および C H₃ から選択される、請求項 1 6 に記載のペプチド。

【請求項 19】

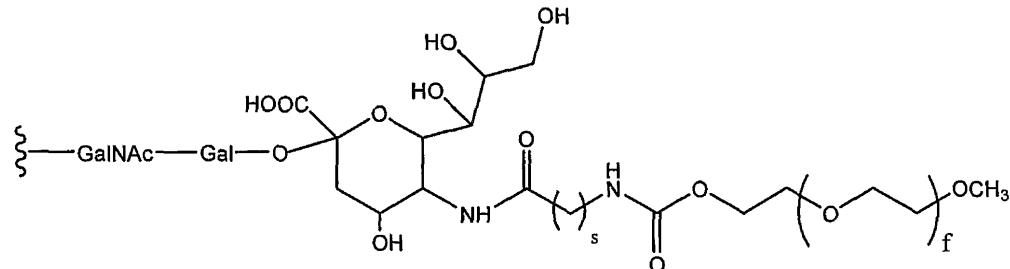
30

前記アミノ酸残基がアスパラギンである、請求項16に記載のペプチド。

【請求項 20】

前記グリコシル連結基が式

【化 1 2】



40

を含んで成る、請求項 1 6 に記載のペプチド。

【請求項 21】

s が 1 であり、f が 200 ~ 300 の整数である、請求項 20 に記載のペプチド。

【請求項 22】

前記アミノ酸残基がセリンまたはトレオニンから選択されるメンバーである、請求項1-6に記載のペプチド。

【請求項 2 3】

50

前記ペプチドが配列番号 1 のアミノ酸配列を有する、請求項 1_6 に記載のペプチド。

【請求項 2_4】

前記アミノ酸残基が配列番号 1 の位置 1_3_3 におけるトレオニンである、請求項 2_3 に記載のペプチド。

【請求項 2_5】

前記ペプチドが配列番号 2 のアミノ酸配列を有する、請求項 1_6 に記載のペプチド。

【請求項 2_6】

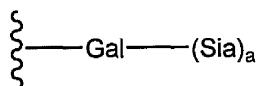
前記アミノ酸残基が配列番号 2 の位置 1_3_4 におけるトレオニンである、請求項 2_5 に記載のペプチド。

【請求項 2_7】

10

(a) グリコシル部分

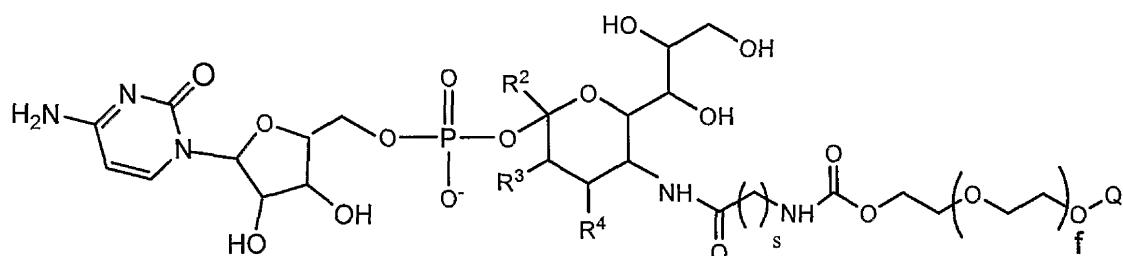
【化 1_3】



を含んで成る基質顆粒球コロニー刺激因子ペプチドを、式

【化 1_4】

20



[式中、a は 0 または 1 である]

を有する PEG - シアル酸ドナーと接触させるステップと、

30

(b) ステップ (a) からの生成物を、前記ドナーから前記グリコシル部分の Gal または Sia へ PEG - シアル酸を移動させる酵素と、前記移動に適切な条件下に接触させるステップと

を含んで成る、請求項 1_6 に記載の顆粒球コロニー刺激因子ペプチドを調製する方法。

【請求項 2_8】

ステップ (a) の前に、

(b) 適切な宿主において前記基質顆粒球コロニー刺激因子ペプチドを発現させるステップ

をさらに含んで成る、請求項 2_7 に記載の方法。

【請求項 2_9】

40

前記宿主が昆虫細胞である、請求項 2_8 に記載の方法。

【請求項 3_0】

前記昆虫細胞が、スpodoptera・フルギペルタ (Spodoptera frugiperda) 細胞系である、請求項 2_9 に記載の方法。

【請求項 3_1】

前記ペプチドをメチオニンと接触させるステップをさらに含んで成る、請求項 2_7 に記載の方法。

【請求項 3_2】

ステップ (b) の後に、前記ペプチドを精製するステップをさらに含んで成り、遊離メチオニンが前記精製するステップ中に存在する、請求項 2_7 に記載の方法。

50

【請求項 3 3】

哺乳類に投与して、前記哺乳類における炎症性白血球産生を刺激するための医薬製剤を製造するための、請求項 1 6 に記載のペプチドの使用。

【請求項 3 4】

対象に投与して、それを必要とする前記対象における感染を治療するための医薬製剤を製造するための、前記対象における状態を緩和する有効な量の請求項 1 6 に記載のペプチドの使用。

【請求項 3 5】

請求項 1 6 に記載の顆粒球コロニー刺激因子ペプチド、および医薬的に許容される担体を含んで成る医薬製剤。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

本出願は、2005年1月10日出願の米国仮特許出願第60/643,437号明細書、2005年3月24日出願の米国仮特許出願第60/665,588号明細書、2005年4月22日出願の米国仮特許出願第60/674,199号明細書、2005年5月25日出願の米国仮特許出願第60/684,851号明細書、および2005年6月23日出願の米国特許出願第11/166,404号明細書の利点を請求するが、その各々はすべての目的のためにその全体が参照により本明細書で援用される。

20

【背景技術】

【0 0 0 2】

発明の背景

顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) は、好中球顆粒球前駆細胞および成熟好中球の生存、増殖、分化、および機能を刺激する糖タンパク質である。臨床的使用における組換えヒトG-CSFの2つの形態は好中球顆粒球形成の強力な刺激因子であり、一部の好中球減少状態の感染性合併症の予防における有効性が明らかにされた。それらは骨髄抑制療法からの好中球回復を加速するために使用されうる。

【0 0 0 3】

G-CSFは、熱性好中球減少症の発生率を削減することによって癌化学療法の死亡率、骨髄移植によって支持される高用量化学療法の死亡率、および重篤な慢性好中球減少症患者における感染の発生率と持続期間を減少させる。さらに、G-CSFは最近、心筋梗塞の発症後に投与されると治療的であることが証明されている。

30

【0 0 0 4】

G-CSFのヒト形態は、1986年に日本および米国のグループによってクローニングされた（例えば、ナガタ（Nagata）ら、Nature 319: 415-418頁、1986年を参照）。天然ヒト糖タンパク質は、1つは175アミノ酸およびもう1つは178アミノ酸である、2つの形態で存在する。より豊富かつより活性の175アミノ酸の形態は、組換えDNA技術によって医薬品の開発において使用されている。

【0 0 0 5】

40

大腸菌 (E. coli) 発現系において合成される組換えヒトG-CSFはフィルグラスチムと呼ばれる。フィルグラスチムの構造は、天然糖タンパク質とわずかに異なる。組換えヒトG-CSFの他の形態はレノグラスチムと呼ばれ、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞で合成される。

【0 0 0 6】

hG-CSFは、2つのG-CSF分子および2つの受容体の2:2の複合体の形成によってG-CSF受容体を二量体化するモノマータンパク質である（ホラン（Horan）ら、Biochemistry, 35(15), 4886-96頁(1996年)）。次のhG-CSF残基は、受容体結合インターフェイスの一環であるX線結晶方位試験によって同定されている。すなわち、G4、P5、A6、S7、S8、L9、P10、Q1

50

1、S 1 2、L 1 5、K 1 6、E 1 9、Q 2 0、L 1 0 8、D 1 0 9、D 1 1 2、T 1 1 5、T 1 1 6、Q 1 1 9、E 1 2 2、E 1 2 3、およびL 1 2 4（例えば、アリトミ（A r i t o m i）ら、（1999年）Nature 401：713頁を参照）。

【0007】

r h G - C S F の市販形態は短期薬理効果を有し、白血球減少状態の持続期間のためにしばしば1日1回より多く投与される必要がある。長い循環半減期を有する分子が、白血球減少症を緩和し、結果として起こる感染を予防するために必要な投与回数を減少させる。現在入手可能なr G - C S F 生成物の別の問題が、用量依存骨痛の発生である。骨痛はr G - C S F による治療の重大な副作用として患者によって経験されるため、この作用を本質的に有さず、または骨痛がもたらされない十分に少用量で有効である生成物によって骨痛をもたらすことがないr G - C S F 生成物を提供することが望ましい。したがって、改善された組換えG - C S F 分子が明らかに必要である。

10

【0008】

h G - C S F のタンパク質工学による変異形が報告されている（米国特許第5,581,476号明細書、米国特許第5,214,132号明細書、米国特許第5,362,853号明細書、米国特許第4,904,584号明細書、およびリードハール・オルソン（R i e d h a a r - O l s o n）ら、B i o c h e m i s t r y 35：9034-9041頁、1996年）。天然ポリペプチドと比べ少なくとも1つの追加の炭水化物鎖を導入するためのh G - C S F および他のポリペプチドの修飾も報告されている（米国特許第5,218,092号明細書）。また、P E G基の結合を含む天然h G - C S F のポリマー修飾が報告され、試験されている（例えば、サタケ・イシカワ（S a t a k e - I s h i k a w a）ら（1992年）、C e l l S t r u c t u r e a n d F u n c t i o n 17：157頁、ボーエン（B o w e n）ら（1999年）E x p e r i m e n t a l H e m a t o l o g y 27：425頁、米国特許第5,824,778号明細書、米国第5,824,784号明細書、国際公開第96/11953号パンフレット、国際公開第95/21629号パンフレット、および国際公開第94/20069号パンフレットを参照）。

20

【0009】

糖タンパク質治療薬の薬物動態特性を改善する試みにおけるペプチド骨格への合成ポリマーの結合は当業界で周知である。ペプチドにコンジュゲートされている代表的なポリマーがポリ（エチレングリコール）（「P E G」）である。ペプチド治療薬を誘導体化するP E Gの使用は、ペプチドの免疫原性を削減することが明らかにされている。例えば、米国特許第4,179,337号明細書（デービス（D a v i s）ら）は、ポリエチレングリコール（P E G）またはポリプロピレングリコールと結合される酵素およびペプチドホルモンなどの非免疫原性ポリペプチドを開示している。免疫原性の削減に加えて、循環におけるクリアランス時間は、問題のポリペプチドのP E Gコンジュゲートのサイズの増大により延長する。

30

【0010】

P E G、およびその誘導体のペプチドへの結合の主要な様態は、ペプチドアミノ酸残基による非特異的結合である（例えば、米国特許第4,088,538号明細書、米国特許第4,496,689号明細書、米国特許第4,414,147号明細書、米国特許第4,055,635号明細書、およびP C T国際公開第87/00056号パンフレットを参照）。P E Gをペプチドへ結合させる別の様態が、糖ペプチド上のグリコシル残基の非特異的酸化によるものである（例えば、国際公開第94/05332号パンフレットを参照）。

40

【0011】

これらの非特異的方法において、ポリ（エチレングリコール）が無作為、非特異的な方法でペプチド骨格上の反応残基に添加される。もちろん、P E G分子の無作為添加は、最終生成物の均質性の欠如、およびペプチドの生物または酵素活性における削減の可能性を含む、その不利点を有する。したがって、治療的ペプチドの生成のために、結果として、

50

特異的に標識され、容易に特徴づけ可能であり、基本的に同種生成物をもたらす誘導体化法が優れている。かかる方法は開発されている。

【0012】

特異的に標識される同種ペプチド治療薬が、酵素の作用によりインピトロで生成されうる。合成ポリマーまたは他の標識をペプチドへ結合させるための代表的な非特異的方法とは異なり、酵素ベースの合成が位置選択性および立体選択性の利点を有する。標識ペプチドの合成において使用されるための2つの主要なクラスの酵素が、グリコシルトランスフェラーゼ（例えば、シアリルトランスフェラーゼ、オリゴ糖転移酵素、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ）、およびグリコシダーゼである。これらの酵素は糖の特異的結合のために使用されうるが、これはその後に治療的部分を含んで成るように修飾されうる。あるいは、グリコシルトランスフェラーゼおよび修飾グリコシダーゼを使用し、修飾糖をペプチド骨格へ直接移動させることができる（例えば、その各々が本明細書で参考により援用される、米国特許第6,399,336号明細書、および米国特許出願公開第20030040037号明細書、同第20040132640号明細書、同第20040137557号明細書、同第20040126838号明細書、および20040142856号明細書を参照）。化学および酵素双方の合成要素を組み合わせる方法も周知である（例えば、参考により本明細書で援用される、ヤマモト（Yamamoto）ら、Carbohydr. Res. 305: 415-422頁（1998年）、および米国特許出願公開第20040137557号明細書を参照）。

10

【発明の開示】

20

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

改善された治療的G-CSFの必要に応じて、本発明は、治療的に活性であり、同一の、または糖PEG化（glycopegylated）されていない密接に類似したG-CSFペプチドに対して改善されている薬物動態パラメータおよび特性を有する糖PEG化G-CSFを提供する。さらに、本発明は、費用効果的にかつ工業規模で本発明の改善されたG-CSFを製造するための方法を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0014】

発明の概要

30

現在、1つもしくはそれ以上のポリ（エチレングリコール）部分による顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）の制御修飾は、対応する天然（非PEG化）G-CSFに対して改善されている薬物動態特性を有する新規G-CSF誘導体を提供することが見出されている（図3）。さらに、糖PEG化G-CSFの薬理活性は、市販のモノPEG化フィルグラスチムとほぼ同じである（図4）。

【0015】

代表的な実施形態において、本発明の「糖PEG化」G-CSF分子が、グリコシル化または未グリコシル化G-CSFペプチドと、その構造内にポリ（エチレングリコール）部分を含む酵素的に移動可能なサッカリール（saccharyl）部分との間のコンジュゲートの酵素媒介形成によって生成される。PEG部分はサッカリール部分に直接（すなわち、2つの反応基の反応によって形成される单一基により）またはリンカー部分、例えば、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル等により結合される。代表的な移動可能なPEGサッカリール構造が図5に記載されている。

40

【0016】

したがって、1つの態様において、本発明は、PEG部分、例えば、PEGと、当該技術分野において承認されているG-CSFと同様または類似のインビボ活性を有するペプチドとのコンジュゲートを提供する。本発明のコンジュゲートにおいて、PEG部分は無傷グリコシル連結基によってペプチドに共有的に結合している。代表的な無傷グリコシル連結基は、PEGで誘導体化されるシアル酸部分を含む。

【0017】

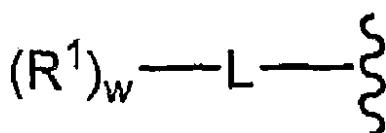
50

ポリマー修飾部分はG - C S Fのグリコシル部分の任意の位置で結合されうる。さらに、ポリマー修飾部分は、野生型または変異G - C S Fペプチドのアミノ酸配列における任意の位置でグリコシル残基に結合される。

[0 0 1 8]

代表的な実施形態において、ポリマー修飾部分は、一般にグリコシルコア上のヘテロ原子（例えば、N、O）により、以下

【化 1 】



10

[式中、R¹はポリマー修飾基であり、Lは結合および連結基から選択される。指数wは1-6、好ましくは1-3、より好ましくは1-2から選択される整数である]に示されるように、リンカー、Lによりグリコシル連結基と結合される。代表的な連結基としては、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル部分、およびシアル酸が挙げられる。リンカーの代表的な成分がアシル部分である。別の代表的な連結基がアミノ酸残基である（例えば、システイン、セリン、リシン、および短いオリゴペプチド、例えば、Lys-Lys、Lys-Lys-Lys、Cys-Lys、Ser-Lys等）。

20

[0 0 1 9]

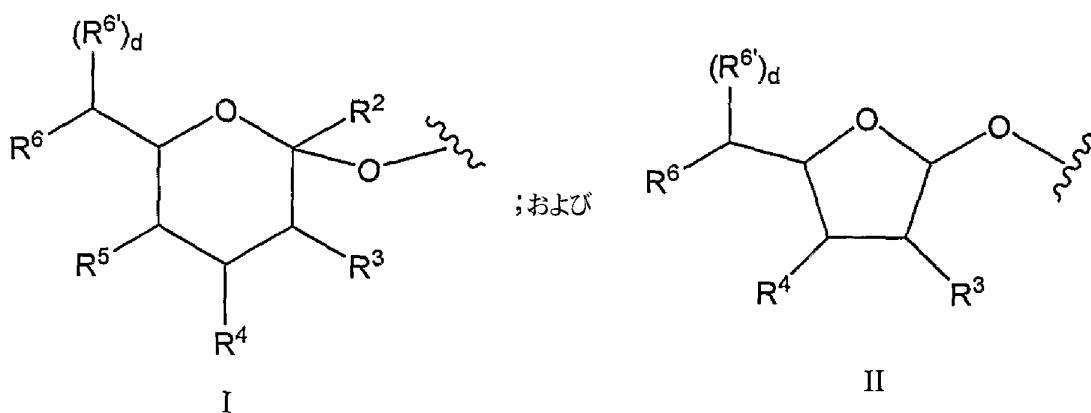
L が結合である場合、これは R¹ の前駆体に対する反応官能基およびグリコシル連結基の前駆体に対する相補的反応性の反応官能基の反応によって形成される。L が非ゼロ順位の連結基である場合、L は R¹ 前駆体との反応前にグリコシル部分上の適所にありうる。あるいは、R¹ の前駆体および L が、その後にグリコシル部分に結合される前もって作られたカセットに組込まれうる。本明細書に記載されているように、適切な反応官能基を有する前駆体の選択および調製は当業者の能力の範囲内である。さらに、前駆体の結合は当該技術分野で十分に理解されている化学反応によって継続する。

30

[00201]

代表的な実施形態において、本発明は、ポリマー修飾部分とのグリコシル連結基によりコンジュゲートされるG-CSFペプチドを提供する。代表的なG-CSFペプチドコンジュゲートとしては

【化2】



40

から選択される式を有するグリコシル連結基が挙げられる。

50

【0021】

式IおよびIIにおいて、R²はH、CH₂OR⁷、COOR⁷、COO⁻M⁺、またはOR⁷であり、ここでR⁷はH、置換もしくは非置換アルキル、または置換もしくは非置換ヘテロアルキルを表す。記号R³、R⁴、R⁵、R⁶およびR^{6'}は独立してH、置換もしくは非置換アルキル、OR⁸、NHC(O)R⁹を表す。M⁺は金属である。指数dは0または1である。R⁸およびR⁹は独立してH、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、またはシアル酸から選択される。R³、R⁴、R⁵、R⁶、またはR^{6'}の少なくとも1つは、ポリマー修飾部分、例えば、PEGを含む。代表的な実施形態において、R⁶およびR^{6'}は、それらが結合されている炭素とともに、シアル部分の側鎖の成分である。さらに代表的な実施形態において、この側鎖はポリマー修飾部分で官能化される。 10

【0022】

本明細書で論じるように、本発明のコンジュゲートにおいて使用されるPEGは線状または分岐でありうる。本発明の本実施形態に記載のペプチドコンジュゲートを含有する分岐PEGを形成する使用の代表的な前駆体は、式

【化3】



を有する。本式に記載の分岐ポリマー種は基本的に純粋な水溶性ポリマーである。X^{3'}は、イオン性（例えば、OH、COOH、H₂PO₄、HSO₃、NH₂、およびその塩など）または他の官能基、例えば、下記を含む部分である。Cは炭素である。X⁵、R¹⁶、およびR¹⁷は独立して非反応基（例えば、H、非置換アルキル、非置換ヘテロアルキル）およびポリマー腕（例えば、PEG）から選択される。X²およびX⁴は、好ましくは、同じまたは異なりうる、生理的条件下に基本的に非反応であるリンクエージ断片である。代表的なリンクエーは芳香族部分もエステル部分も含まない。あるいは、これらのリンクエージは、生理的に関連性のある条件下に、分解するようにデザインされる1つもしくはそれ以上の部分、例えば、エステル、ジスルフィド等を含みうる。X²およびX⁴は、ポリマー腕R¹⁶およびR¹⁷をCに結合する。X^{3'}がリンクエー、糖、またはリンクエー-糖カセットに対する相補的反応性の反応官能基と反応すると、X^{3'}はリンクエージ断片X³の成分に変換される。 30

【0023】

本発明の他の目的および利点は、次の詳細な説明から当業者に明らかであろう。

【発明を実施するための最良の形態】

【0024】

発明の詳細な説明および好ましい実施形態

略語

PEG、ポリ（エチレンギリコール）、PPG、ポリ（プロピレンギリコール）、Ara、アラビノシル、Fru、フルクトシル、Fuc、フコシル、Gal、ガラクトシル、GalNAc、N-アセチルガラクトサミニル、Galc、グルコシル、GalcNAc、N-アセチルグリコサミニル、Man、マンノシル、ManNAc、マンノサミニルアセテート、Xyl、キシロシル、NeuAc、シアルまたはN-アセチルノイロアミニル、Sia、シアルまたはN-アセチルノイロアミニル、M6P、マンノース-6-リン酸、およびその誘導体と類似体。

【0025】

10

20

30

40

50

定義

特に別の規定がない限り、本明細書で使用されるすべての技術および学術用語は一般に、本発明が属する当業者によって一般的に理解されている同じ意味を有する。一般に、本明細書で使用される用語、および細胞培養、分子遺伝学、有機化学反応および核酸化学反応、およびハイブリダイゼーションにおける実験室手順は、当技術分野で公知であり、かつ一般的に使用されているものである。標準方法は核酸およびペプチド合成に使用されている。方法および手順は、一般に当技術分野における従来の方法およびさまざまな一般的の文献（一般に、参照により本明細書で援用される、サンブルック（Sambrook）ら、MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL、第2版（1989年）コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリーア・プレス（Cold Spring Harbor Laboratory Press）、Cold Spring Harbor、ニューヨーク州（N.Y.）を参照）に従い実行されるが、これらは本文書の全体を通じて提供される。本明細書で使用される用語および分析的化学反応における実験手順、および書きの有機合成は、当技術分野で公知のものであり、一般的に使用されている。標準方法、またはそれの修正が化学合成および化学分析に使用される。

【0026】

すべての（本明細書に記載の）オリゴ糖は、非還元サッカリド（すなわち、Gal）の名称および略語の後、グリコシド結合（または）、環結合（1または2）、結合に関する還元サッカリドの環位置（2、3、4、6、または8）、および次いで還元サッカリドの名称または略語（すなわち、GlcNAc）で記載されている。各々のサッカリドは、好ましくは、ピラノースである。標準の糖鎖生物学用語の検討には、Essentials of Glycobiology バルキ（Varki）ら編、CSHLプレス（Press）（1999年）を参照。

【0027】

オリゴ糖は、還元末端でのサッカリドが実際に還元糖であるかどうかに關係なく、還元末端および非還元末端を有するとみなされる。一般に認められた用語に従って、オリゴ糖は本明細書では左に非還元末端、右に還元末端を有するように描かれる。

【0028】

「シアル酸」という語は、9個の炭素のカルボキシル化糖のファミリーのいずれかのメンバーを指す。シアル酸ファミリーの最も一般的なメンバーは、N-アセチル-ノイラミン酸（2-ケト-S-アセトアミド-3,5-ジデオキシ-D-グリセロ-D-ガラクトノヌロピラノース-1-オン酸（しばしばNeu5Ac、NeuAc、またはNANAと略される）。ファミリーの第2のメンバーが、N-グリコールイル-ノイラミン酸（Neu5GcまたはNeuGc）であり、ここでNeuAcのN-アセチル基はヒドロキシル化されている。第3のシアル酸ファミリーのメンバーが、2-ケト-3-デオキシ-ノヌロソン酸（KDN）である（ナダノ（Nadano）ら（1986年）J. Biol. Chem. 261: 11550-11557頁、カナモリ（Kanamori）ら、J. Biol. Chem. 265: 21811-21819頁（1990年））。9-O-ラクトル-Neu5Acまたは9-O-アセチル-Neu5Acのような9-O-C₁-C₆アシル-Neu5Ac、9-デオキシ-9-フルオロ-Neu5Acおよび9-アジド-9-デオキシ-Neu5Acなどの9-置換シアル酸も含まれる。シアル酸ファミリーの検討のためには、例えば、バルキ（Varki）、Glycobiology 2: 25-40頁（1992年）、Sialic Acids: Chemistry, Metabolism and Function、R. Schauer編（シュプリンガー-フェアラーク（Springer-Verlag）、New York（1992年）を参照）。シアリル化法におけるシアル酸化合物の合成および使用は、1992年10月1日刊行の国際公開第92/16640号パンフレットで開示されている。

【0029】

「ペプチド」は、モノマーがアミノ酸であり、アミド結合により結合され、あるいはボ

リペプチドと呼ばれるポリマーを指す。また、非天然アミノ酸、例えば、D-アラニン、フェニルグリシン、およびホモアルギニンも含まれる。遺伝子符号化されていないアミノ酸も本発明において使用されうる。さらに、反応基、グリコシル化部位、ポリマー、治療的部分、生体分子などを含むように修飾されているアミノ酸も本発明において使用されうる。本発明で使用されるアミノ酸のすべては、D-またはL-異性体のいずれかである。L-異性体が一般に好ましい。また、他のペプチド模倣剤も本発明において有用である。本明細書で使用される「ペプチド」は、グリコシル化および未グリコシル化の両方のペプチドを指す。ペプチドを発現する系によって不完全にグリコシル化されるペプチドも含まれる。一般的検討のためには、Spaetola, A. F. C. HEMI STRY AND BIOCHEMISTRY OF AMINO ACIDS, PEP TIDES AND PROTEINS, B. Weinstein編、マルセル・デッカー(Marcel Dekker)、New York、267頁(1983年)を参照。10

【0030】

「ペプチドコンジュゲート」という語は、本明細書に記載されているように、ペプチドが修飾糖でコンジュゲートされている本発明の種を指す。

【0031】

「アミノ酸」という語は、天然起源および合成アミノ酸のほか、天然起源アミノ酸と同様に機能するアミノ酸類似体およびアミノ酸模倣剤を指す。天然起源アミノ酸は、遺伝子コードによって符号化されたもの、および後で修飾されるアミノ酸、例えば、ヒドロキシプロリン、D-カルボキシグルタミン酸塩、およびD-ホスホセリンである。アミノ酸類似体は、天然アミノ酸と同じ基本的な化学構造、すなわち、水素に結合されている炭素、カルボキシル基、アミノ酸、およびR基、例えば、ホモセリン、ノルロイシン、メチオニンスルホキシド、メチオニンメチルスルホニウムを指す。かかる類似体は、修飾R基(例えば、ノルロイシン)または修飾ペプチド骨格を有するが、天然起源アミノ酸と同じ基本的な化学構造を保持する。アミノ酸模倣剤は、アミノ酸の一般化学構造と異なるが、天然起源アミノ酸と同様の方法で機能する化学化合物を指す。20

【0032】

本明細書で使用される「修飾糖」という語は、本発明の工程においてペプチドのアミノ酸またはグリコシル残基へ酵素的に添加される天然または非天然起源炭水化物を指す。修飾糖は、糖ヌクレオチド(一、二、および三リン酸)、活性化糖(例えば、グリコシルハロゲン化物、メシル酸グリコシル)、および活性化されてもヌクレオチドでもない糖を含むが、これらに限定されない酵素基質から選択される。「修飾糖」は「修飾基」と共有官能化されている。有用な修飾基としては、PEG部分、治療的部分、診断的部分、生体分子などが挙げられるが、これらに限定されない。修飾基は、好ましくは、天然起源、または非修飾炭水化物ではない。修飾基による官能化の位置は、「修飾糖」がペプチドへ酵素的に添加されることがないように選択される。30

【0033】

「水溶性」という語は、いくらかの検出可能な程度の水中溶解度を有する部分を指す。水溶性を検出および/または定量化する方法は当業界で公知である。代表的な水溶性ポリマーとしては、ペプチド、サッカリド、ポリ(エーテル)、ポリ(アミン)、ポリ(カルボン酸)などが挙げられる。ペプチドは、単一アミノ酸、例えば、ポリ(リシン)から成る混合配列を有しうる。代表的なポリサッカリドがポリ(シアル酸)である。代表的なポリ(エーテル)がポリ(エチレングリコール)である。ポリ(エチレンイミン)は代表的なポリアミンであり、かつポリ(アクリル)酸は代表的なポリ(カルボン酸)である。40

【0034】

水溶性ポリマーのポリマー骨格はポリ(エチレングリコール)(すなわち、PEG)でありうる。しかし、他の関連ポリマーも本発明の実施における使用に適切であり、PEGまたはポリ(エチレングリコール)という語の使用はこの点で包括的であり、排他的ではないことが意図されていると理解すべきである。PEGという語は、アルコキシPEG、50

二官能性 PEG、多腕 PEG、フォーク状 PEG、分岐 PEG、懸垂(ペンダント、pendent) PEG(すなわち、ポリマー骨格に懸垂する1つもしくはそれ以上の官能基を有するPEGまたは関連ポリマー)、またはそれの中に分解性リンクージを有するPEGを含むその形態のいずれかにポリ(エチレングリコール)を含む。

【0035】

ポリマー骨格は線状または分岐でありうる。分岐ポリマー骨格は一般に当業界で周知である。一般的に、分岐ポリマーは中心分岐コア部分および中心分岐コアに連結した複数の線状ポリマー鎖を有する。PEGは、グリセロール、ペンタエリトリトール、およびソルビトールなどさまざまなポリオールへのエチレンオキシドの添加によって調製されうる分岐形態で一般的に使用される。中心分岐部分は、リシンなど一部のアミノ酸由来でもあります。分岐ポリ(エチレングリコール)は、 $R(-PEG-OH)_m$ として一般形態で表されうるが、ここでRはグリセロールまたはペンタエリトリトールなどのコア部分を表し、mは腕の数を表す。参考により全体として本明細書で援用される、米国特許第5,932,462号明細書に記載されているものなど多腕PEG分子もポリマー骨格として使用されうる。

10

【0036】

多くの他のポリマーも本発明に適切である。非ペプチド性および水溶性であり、2~300個の末端を有するポリマー骨格が、本発明において特に有用である。適切なポリマーの実施例としては、ポリ(プロピレングリコール)(「PPG」)など他のポリ(アルキレングリコール)、エチレングリコールおよびプロピレングリコールなどのコポリマー、参考により全体として本明細書で援用される米国特許第5,629,384号明細書に記載されているものなどのポリ(オキシエチル化ポリオール)、ポリ(オレフィンアルコール)、ポリ(ビニルピロリドン)、ポリ(ヒドロキシプロピルメタクリルアルニド)、ポリ(-ヒドロキシ酸)、ポリ(ビニルアルコール)、ポリホスファゼン、ポリオキサゾリン、ポリ(N-アクリルオイルモルフォリン)、およびコポリマー、テルポリマー、およびその混合物が挙げられるが、これらに限定されない。ポリマー骨格の各々の鎖の分子量は変動しうるが、一般的には約100Da~約100,000Da、しばしば約6,000Da~約80,000Daの範囲である。

20

【0037】

ペプチド薬剤を患者に投与するステップとの関連で「濃度曲線下面積」または「AUC」は、ゼロ~無限の時間の関数として患者における全身循環の濃度を述べる全濃度曲線下面積と定義される。

30

【0038】

ペプチド薬剤を患者に投与するステップとの関連で本明細書で使用される「半減期」または「 $t^{1/2}$ 」という語は、患者における薬剤の血漿濃度が半分に削減するために必要とされる時間と定義される。多数のクリアランス機序、再分布、および当業界で公知の他の機序によってペプチド薬剤に関連する2つ以上の半減期がありうる。通常、アルファおよびベータ半減期が定義され、アルファ相は再分布と関係があり、ベータ相がクリアランスと関係があるようになっている。しかし、大部分、血流に限定されるタンパク質薬剤には、少なくとも2つのクリアランス半減期がありうる。一部のグリコシル化ペプチドについては、急速なベータ相クリアランスは、末端のガラクトース、N-アセチルガラクトサミン、N-アセチルグルコサミン、マンノース、またはフコースを認識するマクロファージ、または内皮細胞上の受容体によって媒介されうる。緩徐なベータ相クリアランスは、有効半径2nm未満(ほぼ68kD)の分子の腎糸球体ろ過、および/または組織における特異的もしくは非特異的取込みおよび代謝によって起こりうる。糖PEG化は、末端の糖(例えば、ガラクトースまたはN-アセチルガラクトサミン)を制限し、それによって、これらの糖を認識する受容体によって急速なアルファ相クリアランスを阻止しうる。これはより大きな有効半径を与え、それによって分布および組織取込みの容積を減少させ、それによって遅発ベータ相を延長しうる。したがって、アルファ相およびベータ相半減期に対する糖PEG化の正確な影響は、当業界で公知であるように、サイズ、グリコシル

40

50

化の状態、および他のパラメータによって変動しうる。「半減期」のさらなる説明が、Pharmaceutical Biotechnology (1997年、DFAクロメリン (Crommellin) および RDシンデラー (Sindelar) 編、ハーヴッド・パブリッシャーズ (Harwood Publishers)、Amsterdam、101-120頁) に存在する。

【0039】

本明細書で使用される「糖コンジュゲーション」という語は、ポリペプチド、例えば、本発明のG-CSFペプチドのアミノ酸またはグリコシル残基への修飾糖種の酵素的に媒介されるコンジュゲーションを指す。「糖コンジュゲーション」の亜属が「糖PEG化」であり、ここでは修飾糖の修飾基はポリ(エチレングリコール)、アルキル誘導体(例えば、m-PEG)、またはその反応誘導体(例えば、H₂N-PEG、HOOC-PEG)である。

【0040】

「大規模」および「工業規模」という語は置換可能に使用され、少なくとも約250mg、好ましくは、少なくとも約500mg、かつより好ましくは、少なくとも約1グラムの糖コンジュゲートを单一反応サイクルの終了時にもたらす反応サイクルを指す。

【0041】

本明細書で使用される「グリコシル連結基」という語は、修飾基(例えば、PEG部分、治療的部分、生体分子)が共有結合されるグリコシル残基を指し、グリコシル連結基は修飾基をコンジュゲートの残りの部分に結合させる。本発明の方法において、「グリコシル連結基」は、グリコシル化または未グリコシル化ペプチドに共有結合され、それによって、薬剤をペプチド上のアミノ酸および/またはグリコシル残基に連結させる。「グリコシル連結基」は一般に「修飾糖」のペプチドのアミノ酸および/またはグリコシル残基との酵素結合による「修飾糖」由来である。グリコシル連結基は、修飾基-修飾糖カセット形成(例えば、酸化シップ塩基形成還元)中に分解されるサッカリド由来構造であります。またはグリコシル連結基が無傷であります。「無傷グリコシル連結基」は、修飾基およびコンジュゲートの残りの部分に連結するサッカリドモノマーが分解されず、例えば、メタ過ヨウ素酸ナトリウムによって酸化されないグリコシル部分由来の連結基を指す。本発明の「無傷グリコシル連結基」は、グリコシル単位の添加または親サッカリド構造からの1つもしくはそれ以上のグリコシルの除去による天然起源オリゴ糖由来であります。

【0042】

本明細書で使用される「標的部分」という語は、体内の特定の組織または部位に選択的に局在する種を指す。局在は、分子決定因子の特異的認識、標的剤またはコンジュゲートの分子サイズ、イオン相互作用、疎水性相互作用などによって媒介される。特定の組織または部位に薬剤を標的する他の機序は当業者に周知である。代表的な標的部分としては、抗体、抗体断片、トランスフェリン、HS-糖タンパク質、凝固因子、血清タンパク質、-糖タンパク質、G-CSF、GM-CSF、M-CSF、EPOなどが挙げられる。

【0043】

本明細書で使用される「治療的部分」は、抗生物質、抗炎症剤、抗腫瘍剤、細胞毒素、および放射性医薬品を含むが、これらに限定されない治療に有用な薬剤を意味する。「治療的部分」としては、生物活性剤のプロドラック、2つ以上の治療的部分が担体、例えば、多価薬剤に結合されている構成物が挙げられる。治療的部分としては、タンパク質、およびタンパク質を含む構成物も挙げられる。代表的なタンパク質としては、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、インターフェロン(例えば、インターフェロン-α、-β、-γ)、インターロイキン(例えば、インターロイキンII)、血清タンパク質(例えば、第VII因子、第VIIa因子、第VIII因子、第IX因子、および第X因子)、ヒト绒毛性ゴナドトロピン(HCG)、卵胞刺激ホルモン(FSH)、および黄体形成ホルモン(LH)、および抗体融合タンパク質(例えば、腫瘍壞死因子受容体(TNFR) / Fcドメイン融合タンパク質)

10

20

30

40

50

) が挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 0 4 4 】

本明細書で使用される「医薬的に許容される担体」としては、コンジュゲートと組合されると、コンジュゲートの活性を保持し、対象の免疫系と非反応性である材料が挙げられる。例としては、リン酸緩衝食塩水、水、油／水エマルジョンなどのエマルジョン、およびさまざまな種類の湿潤剤などの標準的な医薬担体のいずれかが挙げられるが、これらに限定されない。他の担体としては、滅菌溶液、被覆錠剤およびカプセルを含む錠剤も挙げられる。一般的にかかる担体は、でんぶん、牛乳、糖、特定の種類の粘土、ゼラチン、ステアリン酸、またはその塩、ステアリン酸マグネシウムまたはカルシウム、タルク、植物性脂肪または油、ゴム、グリコールなどの賦形剤、または他の既知の賦形剤を含有する。かかる担体は、風味および着色添加剤、または他の成分をも含みうる。かかる担体を含んで成る組成物は、公知の従来の方法によって形成される。

【 0 0 4 5 】

本明細書で使用される「投与するステップ」は、対象に対する経口投与、坐剤、局所接觸、静脈内、腹腔内、筋内、病巣内、鼻腔内として投与、もしくは皮下投与、または持続放出デバイス、例えば、ミニ浸透ポンプの移植を意味する。投与は、非経口、および経粘膜（例えば、経口、鼻、腔、直腸、または経皮）を含むすべての経路による。非経口投与としては、例えば、静脈内、筋内、動脈内、皮内、皮下、腹腔内、脳室内、および頭蓋内が挙げられる。さらに、注射が腫瘍を治療し、例えば、アポトーシスを誘発する場合、投与は腫瘍へ直接、かつ／または腫瘍周囲の組織へ行うことができる。送達の他の様態としては、リポソーム製剤の使用、静脈内注入、経皮パッチ等が挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 0 4 6 】

「緩和すること」または「緩和する」という語は、患者の身体的または精神的健康における症状の軽減、寛解、または減少、または改善など客観的または主観的パラメータを含む病状または状態の治療における奏功の徴候を指す。症状の緩和は、身体検査および／または精神鑑定の結果を含む、客観的または主観的パラメータに基づきうる。

【 0 0 4 7 】

「治療 (therapy)」という語は、疾患にかかりやすいが、未だ疾患の症状を経験または示していない動物における発生からの疾患または状態の予防（予防的治療）、疾患の抑制（その発症の遅滞または停止）、疾患の症状または副作用からの軽減を提供するステップ（緩和治療を含む）、および疾患の軽減（疾患の逆行をもたらす）を含む疾患または状態の「治療 (treating)」または「治療 (treatment)」を指す。

【 0 0 4 8 】

「有効量」もしくは「に有効な量」または「治療に有効な量」あるいは文法的に同等の用語は、疾患を治療するために動物に投与されると、その疾患の治療もたらすのに十分である量を意味する。

【 0 0 4 9 】

「単離」という語は、材料を生成するために使用される成分が実質的または基本的にならない材料を指す。本発明のペプチドコンジュゲートについて、「単離」という語は、通常はペプチドコンジュゲートを調製するために使用される混合物中に材料を伴う成分が実質的または基本的にならない材料を指す。「単離」および「純粋」は同じ意味で使用される。一般的に、本発明の単離ペプチドコンジュゲートは、好ましくは範囲で表される純度のレベルを有する。ペプチドコンジュゲートの純度の範囲の下端は約 60%、約 70%、または約 80% であり、純度の範囲の上端は約 70%、約 80%、約 90%、もしくは約 90% 超である。

【 0 0 5 0 】

ペプチドコンジュゲートが約 90% 超の純度である場合、それらの純度は好ましくは範囲で表される。純度の範囲の下端は約 90%、約 92%、約 94%、約 96%、または約

98 %である。純度の範囲の上端は約92%、約94%、約96%、約98%、または約100%の純度である。

【0051】

純度は当技術分野で承認されている分析方法（例えば、銀染色ゲル上でのバンド強度、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、HPLC、または同様の手段）によって測定される。

【0052】

本明細書で使用される「集団の基本的に各々のメンバー」により、ペプチドに添加される選択された割合の修飾糖がペプチド上の多数の同一の受容体部位に添加される本発明のペプチドコンジュゲートの集団の特徴が記載される。「集団の基本的に各々のメンバー」は、修飾糖にコンジュゲートされたペプチド上の部位の「均質性」を示し、少なくとも約80%、好ましくは、少なくとも約90%、かつより好ましくは、少なくとも約95%同種である本発明のコンジュゲートを指す。 10

【0053】

「均質性」は、修飾糖がコンジュゲートされている受容体部分の集団にわたる構造上的一致を指す。したがって、各々の修飾部分が、すべての他の修飾糖がコンジュゲートされている受容体部位と同じ構造を有する受容体部位にコンジュゲートされている本発明のペプチドコンジュゲートにおいて、ペプチドコンジュゲートは約100%同種であると考えられている。均質性は一般的に範囲で表される。ペプチドコンジュゲートの均質性の範囲の下端は約60%、約70%、または約80%であり、純度の範囲の上端は約70%、約80%、約90%、もしくは約90%超である。 20

【0054】

ペプチドコンジュゲートは約90%以上同種であり、その均質性も好ましくは範囲で表される。均質性の範囲の下端は約90%、約92%、約94%、約96%、または約98%である。純度の範囲の上端は約92%、約94%、約96%、約98%、または約100%の均質性である。ペプチドコンジュゲートの純度は、一般的に、当業者に周知の1つもしくはそれ以上の方法、例えば、液体クロマトグラフィー-質量分析（LC-MS）、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型（MALDI-TOF）、キャピラリー電気泳動などによって測定される。

【0055】

「実質的に均一の糖型」または「実質的に均一のグリコシル化パターン」は、糖ペプチド種を参照すると、目的のグリコシルトランスフェラーゼ（例えば、フコシルトランスフェラーゼ）によってグリコシル化される受容体部分の割合を指す。例えば、1,2フコシルトランスフェラーゼの場合、実質的にG a 1ベータ1,4-G 1c N A c - Rおよびそれのシアリル化類似体の（下記の通り）すべてが本発明のペプチドコンジュゲートにおいてフコシル化されている場合は、実質的に均一のフコシル化パターンが存在する。本明細書に記載のフコシル化構造において、F u c - G 1c N A c リンケージは一般に1,6または1,3であり、1,6が一般に好ましい。出発原料がグリコシル化受容体部分（例えば、フコシル化G a 1 1,4-G 1c N A c - R部分）を含有しうることを当業者によって理解されるであろう。したがって、計算されたグリコシル化率は、本発明の方法によってグリコシル化される受容体部分、および出発原料においてすでにグリコシル化された受容体部分を含む。 30

【0056】

「実質的に均一の」の上記定義における「実質的に」という語は一般に、少なくとも約40%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、またはより好ましくは少なくとも約90%、かつさらにより好ましくは少なくとも約95%の特定のグリコシルトランスフェラーゼの受容体部分がグリコシル化されていることを意味する。

【0057】

置換基が従来の化学式によって指定され、左から右へ書かれている場合、それらは同等に化学的に同一の置換を包含するが、これは構造を右から左へ書くことに由来し、例えば、-C H₂ O-は、-O C H₂-も開示することが意図されている。 50

【0058】

「アルキル」という語は、単独で、または別の置換の一部として、特に明記しない限り、直鎖もしくは分岐鎖、または環状炭化水素ラジカル、またはその組合せを意味するが、これは完全に飽和され、モノまたはポリ不飽和されるとともに、示された炭素原子の数（すなわち、C₁ - C₁₀ は 1 ~ 10 個の炭素を意味する）を有する、二または多価ラジカルを含みうる。飽和炭化水素ラジカルの例としては、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、t-ブチル、イソブチル、sec-ブチル、シクロヘキシル、（シクロヘキシル）メチル、シクロプロピルメチル、例えば、n-ペンチル、n-ヘキシル、n-ヘプチル、n-オクチルなどのホモログおよび異性体が挙げられるが、これらに限定されない。非飽和アルキル基は、1つもしくはそれ以上の二重結合または三重結合を有するものである。非飽和アルキル基の例としては、ビニル、2-プロペニル、クロチル、2-イソペンテニル、2-(ブタジエニル)、2,4-ペンタジエニル、3-(1,4-ペンタジエニル)、エチニル、1-および3-プロピニル、3-ブチニル、および高いホモログと異性体が挙げられるが、これらに限定されない。「アルキル」という語は、特に言及されていない限り、「ヘテロアルキル」など、以下で詳細に定義されるアルキルの誘導体を含むことも意味される。炭化水素基に限定されるアルキル基は「ホモアルキル」と呼ばれる。10

【0059】

「アルキレン」という語は、単独で、または別の置換の一部として、限定されることなく、-CH₂CH₂CH₂CH₂-によって例示された通り、アルカン由来の二価ラジカルを意味し、さらに「ヘテロアルキレン」としての下記の基を含む。一般的に、アルキル（またはアルキレン）基は1~24個の炭素原子を有し、10個以下の炭素原子を有する基が本発明において好ましい。「低級アルキル」または「低級アルキレン」は短鎖アルキルまたはアルキレン基であり、一般に8個以下の炭素原子を有する。20

【0060】

「アルコキシ」、「アルキルアミノ」、および「アルキルチオ」（またはチオアルコキシ）という語はその従来の意味で使用され、それぞれ、酸素原子、アミノ基、またはイオウ原子によって分子の残りの部分に結合したアルキル基を指す。

【0061】

「ヘテロアルキル」という語は、単独で、または別の語と組合せて、特に明記しない限り、安定した直鎖もしくは分岐鎖、または環状炭化水素ラジカル、または、明記された数の炭素原子、およびO、N、Si、およびSから成る基から選択される少なくとも1つのヘテロ原子から成るその組合せを意味し、ここで窒素およびイオウ原子は、場合により、酸化され、かつ窒素ヘテロ原子は、場合により、四級化されうる。ヘテロ原子O、NおよびSおよびSiは、ヘテロアルキル基の内部位置、またはアルキル基が分子の残りの部分に結合した位置に配置されうる。例としては、-CH₂-CH₂-O-CH₃、-CH₂-CH₂-NH-CH₃、-CH₂-CH₂-N(CH₃)-CH₃、-CH₂-S-CH₂-CH₃、-CH₂-CH₂-S(O)-CH₃、-CH₂-CH₂-S(O)₂-CH₃、-CH=CH-O-CH₃、-Si(CH₃)₃、-CH₂-CH=N-OC_H₃、および-CH=CH-N(CH₃)-CH₃が挙げられるが、これらに限定されない。2個までのヘテロ原子、例えば、-CH₂-NH-OCH₃、および-CH₂-O-Si(CH₃)₃などが連続的でありうる。同様に、「ヘテロアルキレン」という語は、単独で、または別の置換一環として、限定されることなく、-CH₂-CH₂-S-CH₂-CH₂-および-CH₂-S-CH₂-CH₂-NH-CH₂-によって例示されている通り、ヘテロアルキル由来の二価ラジカルを意味する。ヘテロアルキレン基について、ヘテロ原子は鎖末端（例えば、アルキレンオキシ、アルキレンジオキシ、アルキレンアミノ、アルキレンジアミノなど）のいずれかまたは両方をも占めうる。さらに、アルキレンおよびヘテロアルキレン連結基については、連結基の配向は、連結基の式が書かれている方向によって示されない。例えば、式-C(O)₂R'は、-C(O)₂R'および-R'C(O)₂を表す。304050

【0062】

「シクロアルキル」および「ヘテロシクロアルキル」という語は、単独で、または他の語と組合せて、特に明記しない限り、それぞれ、「アルキル」および「ヘテロアルキル」の環状変形を表す。また、ヘテロシクロアルキルについて、ヘテロ原子は、ヘテロサイクルが分子の残りの部分に結合している位置を占めうる。シクロアルキルの例としては、シクロペンチル、シクロヘキシリル、1-シクロヘキセニル、3-シクロヘキセニル、シクロヘプチルなどが挙げられるが、これらに限定されない。ヘテロシクロアルキルの例としては、1-(1,2,5,6-テトラヒドロピリジル)、1-ピペリジニル、2-ピペリジニル、3-ピペリジニル、4-モルホリニル、3-モルホリニル、テトラヒドロフラン-2-イル、テトラヒドロフラン-3-イル、テトラヒドロチエン-2-イル、テトラヒドロチエン-3-イル、1-ピペラジニル、2-ピペラジニルなどが挙げられるが、これらに限定されない。

【0063】

「ハロ」または「ハロゲン」という語は、単独で、または別の置換の一部として、特に明記しない限り、フッ素、塩素、臭素、またはヨウ素原子を意味する。また、「ハロアルキル」などの語は、モノハロアルキルおよびポリハロアルキルを含むことが意味される。例えば、「ハロ(C₁-C₄)アルキル」という語は、トリフルオロメチル、2,2,2-トリフルオロエチル、4-クロロブチル、3-ブロモブロピルなどを含むが、これらに限定されないことが意味される。

【0064】

「アリール」という語は、特に明記しない限り、融合され、または共有結合されている単一環または多重環(好ましくは、1~3個の環)でありうるポリ非飽和、芳香族、置換を意味する。「ヘテロアリール」という語は、N、O、およびSから選択される1~4個のヘテロ原子を含有するアリール基(または環)を指し、ここで窒素およびイオウ原子は場合により酸化され、窒素原子は場合により四級化される。ヘテロアリール基は、ヘテロ原子により分子の残りの部分に結合されうる。アリールおよびヘテロアリール基の非限定的例としては、フェニル、1-ナフチル、2-ナフチル、4-ビフェニル、1-ピロリル、2-ピロリル、3-ピロリル、3-ピラゾリル、2-イミダゾリル、4-イミダゾリル、ピラジニル、2-オキサゾリル、4-オキサゾリル、2-フェニル-4-オキサゾリル、5-オキサゾリル、3-イソオキサゾリル、4-イソオキサゾリル、5-イソオキサゾリル、2-チアゾリル、4-チアゾリル、5-チアゾリル、2-フリル、3-フリル、2-チエニル、3-チエニル、2-ピリジル、3-ピリジル、4-ピリジル、2-ピリミジル、4-ピリミジル、5-ベンゾチアゾリル、ブリニル、2-ベンズイミダゾリル、5-インドリル、1-イソキノリル、5-イソキノリル、2-キノキサリニル、5-キノキサリニル、3-キノリル、テトラゾリル、ベンゾ[b]フラニル、ベンゾ[b]チエニル、2,3-ジヒドロベンゾ[1,4]ジオキシン-6-イル、ベンゾ[1,3]ジオキソール-5-イル、および6-キノリルが挙げられる。上記アリールおよびヘテロアリール環系の各々の置換基は、下記の許容される置換の基から選択される。

【0065】

簡潔さのために、「アリール」という語は、他の語(例えば、アリールオキシ、アリールチオキシ、アリールアルキル)と組合せて使用されると、上記のアリールとヘテロアリール環の両方を含む。したがって、「アリールアルキル」という語は、炭素原子(例えば、メチレン基)が、例えば、酸素原子(例えば、フェノキシメチル、2-ピリジルオキシメチル、3-(1-ナフチルオキシ)プロピルなど)によって置換されているアルキル基を含むアルキル基(例えば、ベンジル、フェネチル、ピリジルメチルなど)にアリール基が結合されているラジカルを含むことが意味される。

【0066】

上記の語の各々(例えば、「アルキル」、「ヘテロアルキル」、「アリール」、および「ヘテロアリール」)は、指示ラジカルの置換および非置換形態を含むことが意味される。各々の型のラジカルの好ましい置換基は以下に示されている。

【0067】

アルキルおよびヘテロアルキルラジカル（アルキレン、アルケニル、ヘテロアルキレン、ヘテロアルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、シクロアルケニル、およびヘテロシクロアルケニルとしばしば呼ばれる基を含む）の置換基は、一般的に「アルキル基置換基」と呼ばれ、それらは、-OR'、=O、=NR'=N-OR'、-NR'R''、-SR'、-ハロゲン、-SiR'R''R'''、-OC(O)R'、-C(O)R'、-CO₂R'、-CONR'R''、-OC(O)NR'R''、-NR'C(O)R'、-NR-C(O)NR'R''R'''、-NR'C(O)₂R'、-NR-C(NR'R''R''')=NR'''、-NR-C(NR'R''')=NR'''、-S(O)R'、-S(O)₂R'、-S(O)₂NR'R''、-NR₂R'、-CN、および-NO₂であるが、これらに限定されないものから選択されるさまざまな基の1つもしくはそれ以上でありうるが、数字の範囲はゼロ～(2m'+1)であり、ここでm'はかかるラジカルにおける炭素原子の総数である。R'、R''、R'''、およびR''''は各々好ましくは独立して水素、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換アリール、例えば、1-3個のハロゲンで置換されたアリール、置換もしくは非置換アルキル、アルコキシもしくはチオアルコキシ基、またはアリールアルキル基を指す。本発明の化合物が2つ以上のR基を含む場合、例えば、R基の各々が独立して、これらの基の2つ以上が存在する場合に各々R'、R''、R'''、およびR''''であるように選択される。R'およびR''が同じ窒素原子に結合されている場合、それらは窒素原子と組合され、5-、6-、または7-員環を形成しうる。例えば、-NR'R''は、1-ピロリジニルおよび4-モルホリニルを含むが、これらに限定されないことが意味される。置換基の上記の議論から、当業者は、「アルキル」という語が、ハロアルキル（例えば、-CF₃および-CH₂CF₃）およびアシル（例えば、-C(O)CH₃、-C(O)CF₃、-C(O)CH₂OCH₃など）などの水素基以外の基に結合された炭素原子を含む基を含むことが意味されることを理解するであろう。

【0068】

アルキルラジカルについて記載された置換基と同様、アリールおよびヘテロアリール基の置換基は一般的に「アリール基置換」と呼ばれる。置換基は、例えば、ハロゲン、-OR'、=O、=NR'、=N-OR'、-NR'R''、-SR'、-ハロゲン、-SiR'R''R'''、-OC(O)R'、-C(O)R'、-CO₂R'、-CONR'R''、-OC(O)NR'R''、-NR'C(O)R'、-NR-C(O)NR'R''R'''、-NR'''、-NR-C(NR'R''')=NR'''、-S(O)R'、-S(O)₂R'、-S(O)₂NR'R''、-NR₂R'、-CNおよび-NO₂、-R'、-N₃、-CH(Ph)₂、フルオロ(C₁-C₄)アルコキシ、およびフルオロ(C₁-C₄)アルキルから選択されるが、数字の範囲はゼロ～芳香族系での開放価の総数であり、かつここでR'、R''、R'''、およびR''''は好ましくは独立して水素、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換アリール、および置換もしくは非置換ヘテロアリールから選択される。本発明の化合物が2つ以上のR基を含む場合、例えば、R基の各々が独立して、これらの基の2つ以上が存在する場合に各々R'、R''、R'''、およびR''''であるように選択される。次のスキームにおいて、記号Xは上記の「R」を表す。

【0069】

アリールまたはヘテロアリール環の隣接原子上の置換基の2つが、場合により、式-T-C(O)-(CRR')_u-U- [式中、TおよびUは独立して-NR-、-O-、-CRR' -または単一結合であり、uは0～3の整数である]の置換基で置換されうる。あるいは、アリールまたはヘテロアリール環の隣接原子上の置換基の2つが、場合により、式-A-(CH₂)_r-B- [式中、AおよびBは独立して-CRR' -、-O-、-NR-、-S-、-S(O)-、-S(O)₂-、-S(O)₂NR' -、または単一結合

10

20

30

40

50

であり、 r は 1 ~ 4 の整数で 4 ある] の置換基で置換されうる。こうして形成された新しい環の単一結合の 1 つが、場合により、二重結合で置換されうる。あるいは、アリールまたはヘテロアリール環の隣接原子上の置換基の 2 つが、場合により、式 - (C R R ') z - X - (C R ' ' R ' ' ') d - [式中、 z および d は独立して 0 ~ 3 の整数であり、かつ X は - O - 、 - N R ' - 、 - S - 、 - S (O) - 、 - S (O) 2 - 、または - S (O) 2 N R ' - である] の置換基で置換されうる。置換基 R、R'、R' '、および R' ' ' は、好ましくは、独立して水素または置換もしくは非置換 (C ₁ - C ₆) アルキルから選択される。

【 0 0 7 0 】

本明細書で使用される「ヘテロ原子」という語は、酸素 (O) 、窒素 (N) 、イオウ (S) 、およびケイ素 (Si) を含むことが意味される。

【 0 0 7 1 】

はじめに

本発明は、G - C S F でのグリカン構造の修飾のための方法を包含する。G - C S F は、活性化 T 細胞、マクロファージ、内皮細胞、および間質線維芽細胞によって生成されるサイトカインとして当業界で公知である。G - C S F は主に骨髄で作用し、炎症性白血球の産生を増大させ、さらに内分泌性ホルモンとして作用し、炎症性機能中に消費される好中球の補充を開始させる。G - C S F には化学療法後の骨髄置換における臨床用途もある。

【 0 0 7 2 】

本発明は、顆粒球コロニー刺激因子 (G - C S F) のコンジュゲートを提供する。本発明は、顆粒球コロニー刺激活性を有するグリコシリ化および未グリコシリ化ペプチドのコンジュゲートを提供する。コンジュゲートは、治療的部分、診断的部分、標的的部分などなどのさまざまな種によるコンジュゲーションによって追加的に修飾されうる。

【 0 0 7 3 】

本発明はさらに、G - C S F の再構築および / または修飾の方法を含む。G - C S F は、多数の疾患の治療における有益な手段であるが、上記の通り、その臨床的有効性はその比較的不良な薬物動態によって阻まれている。

【 0 0 7 4 】

代表的な実施形態において、本発明の G - C S F ペプチドが、特定の種類の放射線療法、化学療法、および骨髄移植を受ける癌患者における感染を予防する目的のために患者に投与され、原因にかかわらず、重篤な慢性または相対的白血球減少症の治療のために末梢血前駆細胞移植における収集のための前駆細胞を動員し、かつ急性骨髄性白血病患者の治療を支持しうる。また、本発明のポリペプチドコンジュゲートまたは組成物は、AIDS または他の免疫不全疾患および細菌感染の治療に使用されうる。

【 0 0 7 5 】

G - C S F はクローニングされ、配列決定されている。代表的な実施形態において、G - C S F は、配列番号 1 または配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有する。当業者は、本発明が本明細書に示された配列に限定されないだけではなく、本明細書での上記の通り、G - C S F の変異形を含むことも容易に十分に理解するであろう。

【 0 0 7 6 】

したがって、本発明はさらに、当業界で公知の G - C S F 変異形を包含する。一例として、ただし決して本発明を限定するためではなく、G - C S F 変異形は米国特許第 6,166,183 号明細書に記載されており、ここでリシン残基の非天然相補体を含んで成り、さらに 1 つもしくは 2 つのポリエチレングリコール分子に連結された G - C S F が記載されている。また、米国特許第 6,004,548 号明細書、同第 5,580,755 号明細書、同第 5,582,823 号明細書、および同第 5,676,941 号明細書では G - C S F 変異形が記載されており、ここでは位置 17、36、42、64、および 74 における 1 つもしくはそれ以上のシステイン残基がアラニン、または代わりとしてセリンによって置換されている。米国特許第 5,416,195 号明細書は、位置 17 でシステ

10

20

30

40

50

イン、位置 27 でアスパラギン酸、および位置 65 および 66 でセリンが、それぞれ、セリン、セリン、プロリン、およびプロリンで置換されている G-CSF 分子を記載している。他の変異形は当業界で公知であり、例えば、米国特許第 5,399,345 号明細書に記載されている。さらなる変異形は配列番号 3-11 から選択されるアミノ酸を有する。

【0077】

本発明の修飾 G-CSF の発現および活性は、当業界で公知の方法を使用し、かつ、例えば、米国特許第 4,810,643 号明細書に記載されている通り評価されうる。一例として、活性は、放射性標識チミジン取込みアッセイを使用して測定されうる。手短に言えば、健康なドナーからのヒト骨髄を Ficoll-Hyque (1.077 g / mL)、ファルマシア (Pharmacia)、Piscataway、ニュージャージー州 (NJ) による密度カットにかけ、低密度細胞を、10%ウシ胎仔血清、グルタミン、および抗生物質を含有するイスコープ (Iscope) 培地 (ジブコ (GIBCO)、La Jolla、カリフォルニア州 (CA)) 中に懸濁する。約 2×10^4 ヒト骨髄細胞を対照培地または本発明の G-CSF のいずれかで 96 ウエル平底プレートにおいて約 37 下、大気中 5% CO₂ で約 2 日間インキュベートする。次いで、培養物を約 4 時間、0.5 μCi / ウエルの ³H-チミジン (ニュー・イングランド・ヌークレア (New England Nuclear)、Boston、マサチューセッツ州 (Mass.)) でパルスし、例えば、ベンチュア (Ventua) ら (1983 年、Blood 61: 781 頁) に記載されている通り取込みを測定する。対照化合物で処理した骨髄細胞と比較したヒト骨髄細胞への ³H-チミジン取込みの増大が、活性および有望な G-CSF を示す。

【0078】

上記の通り、本発明のコンジュゲートは、修飾糖のグリコシル化または未グリコシル化 G-CSF ペプチドとの酵素結合によって形成される。修飾糖は、G-CSF ペプチドと糖上の修飾基との間に挿入されると、本明細書では例えば、「無傷グリコシル連結基」と呼ばれるものになる。グリコシルトランスフェラーゼなど酵素の優れた選択性を使用することにより、本方法は、1 つもしくはそれ以上の特定の位置で所望の基を有するペプチドを提供する。したがって、本発明によれば、修飾糖が直接、G-CSF ペプチド鎖上の選択位置に結合され、あるいは、修飾糖は糖ペプチドの炭水化物部分へ付加される。修飾糖が糖ペプチド炭水化物、および G-CSF ペプチド骨格のアミノ酸残基に直接結合されているペプチドも本発明の範囲内である。

【0079】

既知の化学的および酵素的ペプチド精緻化法とは対照的に、本発明の方法は、実質的に同種の誘導体化パターンを有するペプチドおよび糖ペプチドをアセンブルすることを可能にし、本発明において使用される酵素は一般に特定のアミノ酸残基または G-CSF ペプチドのアミノ酸残基の組合せに対して選択的である。この方法は、修飾ペプチドおよび糖ペプチドの大規模製造にも実用的である。したがって、本発明の方法は、予め選択された均一の誘導体化パターンを有する糖ペプチドの大規模調製のための実用的な手段を提供する。この方法は、詳しくは、細胞培養細胞 (例えば、哺乳類細胞、昆虫細胞、植物細胞、真菌細胞、酵母細胞、または原核細胞) またはトランスジェニックの植物もしくは動物における製造中に不完全にグリコシル化される糖ペプチドを含むがこれに限定されない治療的ペプチドの修飾に適切である。

【0080】

本発明は、例えば、免疫もしくは細網内皮系 (RES) によるクリアランス率の削減、または取込み率の削減による治療的半減期が増大されたグリコシル化および未グリコシル化 G-CSF ペプチドのコンジュゲートも提供する。さらに、本発明の方法は、ペプチド上の抗原決定基をマスキングするための手段を提供し、したがって、ペプチドに対する宿主免疫反応を削減または除去する。標的剤の選択的結合を使用し、特定の標的剤に特異的である特定の組織または細胞表面受容体にペプチドを標的することもできる。

【0081】

コンジュゲート

第1の態様において、本発明は、選択修飾基とG-CSFペプチドとの間にコンジュゲートを提供する。

【0082】

ペプチドと修飾部分との連結は、ペプチドと選択部分との間に挿入されたグリコシル連結基を含む。本明細書で論じるように、選択修飾部分は基本的にサッカリド単位に結合されうる種であり、結果として、修飾糖をペプチドへ付加する適切なトランスフェラーゼ酵素、またはそれに結合されたグリコシル基によって認識される「修飾糖」がもたらされる。修飾糖のサッカリド成分は、ペプチドと選択部分との間に挿入されると、「グリコシル連結基」、例えば、「無傷グリコシル連結基」になる。グリコシル連結基は、修飾基による修飾後、修飾糖をペプチドのアミノ酸またはグリコシル残基に添加する酵素の基質である単糖またはオリゴ糖から形成される。

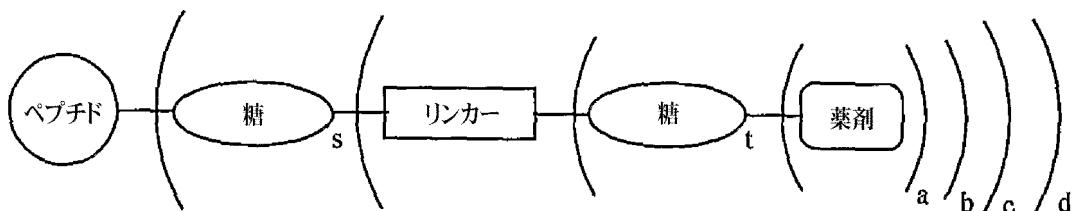
【0083】

グリコシル連結基は、修飾基の添加前またはその最中に分解的に修飾されるサッカリド部分であり、またはこれを含みうる。例えば、グリコシル連結基は、例えば、メタ過ヨウ素酸の作用によって、対応するアルデヒドへの無傷サッカリドの酸化的分解反応によって生成され、その後に適切なアミンでシップ塩基に変換され、これが次いで、対応するアミンに還元されるサッカリド残基由来でありうる。

【0084】

本発明のコンジュゲートは一般に一般構造

【化4】



[式中、記号a、b、c、d、およびsは正の、ゼロ以外の整数を表し、tは0または正の整数のいずれかである。「薬剤」は治療薬、生物活性薬、検出可能な標識、水溶性部分（例えば、PEG、m-PEG、PPG、およびm-PPG）または同様のものである。「薬剤」はペプチド、例えば、酵素、抗体、抗原等でありうる。リンカーは下記の多様な連結基でありうる。あるいは、リンカーは単一結合または「ゼロ順位リンカー」でありうる]に対応する。

【0085】

代表的な実施形態において、選択修飾基は水溶性ポリマー、例えば、m-PEGである。水溶性ポリマーはグリコシル連結基によってペプチドに共有結合されている。グリコシル連結基はペプチドのアミノ酸残基またはグリコシル残基に共有結合されている。本発明は、アミノ酸残基およびグリコシル残基がグリコシル連結基で修飾されているコンジュゲートをも提供する。

【0086】

代表的な水溶性ポリマーはポリ(エチレングリコール)、例えば、メトキシポリ(エチレングリコール)である。本発明で使用されるポリ(エチレングリコール)は、特定の形態または分子量範囲に制限されていない。非分岐ポリ(エチレングリコール)分子については、分子量は、好ましくは、500~100,000である。2000-60,000の分子量が好ましくは使用され、好ましくは、約5,000~約30,000である。

【0087】

別の実施形態において、ポリ(エチレングリコール)は、付加された2つ以上のPEG部分を有する分岐PEGである。分岐PEGの例は、米国特許第5,932,462号明

10

20

30

40

50

細書、米国特許第5,342,940号明細書、米国特許第5,643,575号明細書、米国特許第5,919,455号明細書、米国特許第6,113,906号明細書、米国特許第5,183,660号明細書、国際公開第02/09766号パンフレット、コデラ(Kodera)Y.、Bioconjugate Chemistry 5:283-288頁(1994年)、およびヤマサキ(Yamasaki)ら、Agric. Biol. Chem. 52:2125-2127頁、1998年に記載されている。好ましい実施形態において、分歧PEGの各々のポリ(エチレングリコール)の分子量は、40,000ダルトン以下である。

【0088】

酵素的に添加されるグリコシル連結基により形成されるコンジュゲートを提供するステップに加えて、本発明は、その置換パターンがきわめて同種であるコンジュゲートを提供する。本発明の方法の使用により、本発明のコンジュゲートの集団にわたって修飾糖部分の基本的にすべてが構造的に同一のアミノ酸またはグリコシル残基に結合されるペプチドコンジュゲートを形成することが可能である。したがって、第2の態様において、本発明は、グリコシル連結基、例えば、無傷グリコシル連結基によりペプチドに共有結合される水溶性ポリマー部分の集団を有するペプチドコンジュゲートを提供する。本発明の好ましいコンジュゲートにおいて、基本的に集団の各々のメンバーはグリコシル連結基によってペプチドのグリコシル残基に結合され、グリコシル連結基が結合されるペプチドの各々のグリコシル残基は同じ構造を有する。

【0089】

グリコシル連結基によりそれに共有結合された水溶性ポリマー部分の集団を有するペプチドコンジュゲートも提供される。好ましい実施形態において、水溶性ポリマー部分の集団の基本的にすべてのメンバーは、グリコシル連結基によってペプチドのアミノ酸残基に結合され、それに結合されたグリコシル連結基を有するアミノ酸残基は同じ構造を有する。

【0090】

本発明は、ペプチドが治療的部分、診断的部分、標的部分、毒素部分、または同様のものに無傷グリコシル連結基によってコンジュゲートされている上記のものと類似のコンジュゲートをも提供する。上記部分の各々は小分子、非天然ポリマー(例えば、ポリペプチド)または合成ポリマーでありうる。修飾部分がシアル酸に結合されている場合、修飾部分は実質的に非蛍光であることが好ましい。

【0091】

任意の配列を有する基本的にいずれかの顆粒球コロニー刺激因子ペプチドまたは薬剤は、本発明のコンジュゲートのペプチド成分として使用される。顆粒球コロニー刺激因子はクローン化され、配列決定されている。代表的な例において、G-CSFペプチドは配列番号1に示されている配列を有する。すなわち、

【化5】

MTPLGPASSLPQSFLLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLCAKYK
LCHPEELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLSQLHSGL
FLYQQLLQALEGISPELGPTLDTLQLDVAADFATTIWQQMEE
LGMAPALQPTQGAMPAFASAQRRAGGVLVASHLQSFLEV
SYRVLRLAQP (配列番号:1)

【0092】

別の代表的な例において、G-CSFペプチドは配列番号2に示されている配列を有す

10

20

30

40

50

る。すなわち、

【化6】

TPLGPASSLPQSFLLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLCA TYKL
CHPEELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLSQLHSGLF
LYQGLLQALEGISPELGPLDTLQLDVADFATTIWQQMEEL
GMAPALQPTQGAMPAFASA FQR RAGGV LVASHLQS FLEVS
YRVLRH LAQP (配列番号: 2)

10

【0093】

別の代表的な例において、G - C S Fペプチドは以下の配列番号3 - 11に示されている配列を有する。すなわち、

【化7】

MTPLGPASSLPQSFLLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLVSECA
TYKLCHPEELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLSQL
HSGLFLYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQLDVADFATTIWQ
QMEELGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVLVASHLQ
SFLEVSYRVLRLAQP (配列番号: 3) 10

MAGPATQSPMKLMAQLLLLWHSALWTVQEATPLGPASSL
PQSFLLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLCAKYKLCHPEELVLL
GHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLSQLHSGLFLYQGLLQA
LEGISPELGPTLDTLQLDVADFATTIWQQMEELGMAPALQP
TQGAMPAFASAFQRRAGGVLVASHLQSFL
EVSYRVLRLAQP (配列番号: 4) 20

MAGPATQSPMKLMAQLLLLWHSALWTVQEATPLGPASSL
PQSFLLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLVSECA
TYKLCHPEELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLSQLHS
GLFLYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQLDVADFATTIWQQMEELGMAPA
LQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVLVASHLQSFL
EVSYRVLRLAQP (配列番号: 5) 30

MVTPLGPASSLPQSFLLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLCA
TYKLCHPEELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLSQLHS
GLFLYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQLDVADFATTIWQQMEELGMAPA
LQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVLVASHLQSFL
EVSYRVLRLAQP (配列番号: 6) 40

【化8】

MTPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLCAKYK
 LCHPEELVLLGHTLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLSQLHSGL
 FLYQGLLQALEGISPELGPTLDLQLDVADFATTIWQQMEE
 LGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVLVASHLQSLEV
 SYRVLRLAQP (配列番号: 7)

10

MVTPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLCAKY
 KLCHPEELVLLGSSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLSQLHSGL
 LFLYQGLLQALEGISPELGPTLDLQLDVADFATTIWQQME
 ELGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVLVASHLQSLEV
 VSYRVLRLAQP (配列番号: 8)

20

MQTPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLCAKY
 KLCHPEELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLSQLHS
 GLFLYQGLLQALEGISPELGPTLDLQLDVADFATTIWQQM
 EELGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVLVASHLQSFL
 EVSYRVLRLAQP (配列番号: 9)

30

MTPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLCAKYK
 LCHPEELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLSQLHSGL
 FLYQGLLQALEGISPELGPTLDLQLDVADFATTIWQQMEE
 LGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVLVASHLQSLEV
 SYRVLRLAQP (配列番号: 10); および

40

MTPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLCAKYK
 LCHPEELVLLGSSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLSQLHSGL
 FLYQGLLQALEGISPELGPTLDLQLDVADFATTIWQQMEE
 LGMAPTTPTQTAMPAPFASAFQRRAGGVLVASHLQSLEV
 SYRVLRLAQP (配列番号: 11)

【0094】

本発明は、決して本明細書に記載の配列に限定されない。ペプチドの特性を増加または減少させ、または構造的特徴を変更するために突然変異される他の配列のG-CSFペプチドの使用が本発明の範囲内である。例えば、本発明において使用される変異G-CSFペプチドは、追加のO-グリコシル化部位または他の位置でのかかる部位が供給されるものを含む。さらに、1つもしくはそれ以上のN-グリコシル化部位を含む変異ペプチドが本発明において使用される。

【0095】

好ましくは、G-CSFペプチドのアミノ末端もカルボキシ末端もポリマー修飾部分で

50

誘導体化されない。

【0096】

本発明のペプチドは、少なくとも1つのO連結またはN連結グリコシル化部位を含み、これはポリマー修飾部分、例えば、PEG部分を含むグリコシル残基でグリコシル化される。代表的な実施形態において、PEGは無傷グリコシル連結基によってペプチドに共有結合されている。グリコシル連結基は、ペプチドのアミノ酸残基またはグリコシル残基のいずれかに共有結合されている。あるいは、グリコシル連結基は、糖ペプチドの1つもしくはそれ以上のグリコシル単位に結合されている。本発明は、グリコシル連結基がアミノ酸残基およびグリコシル残基に結合されているコンジュゲートをも提供する。

【0097】

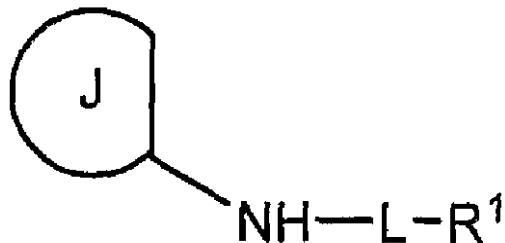
10

PEG部分は無傷グリコシルリンカーに直接、または非グリコシルリンカー、例えば、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキルによって結合されている。

【0098】

代表的な実施形態において、本発明は式

【化9】



20

[式中、Jはグリコシル部分（例えば、ヌクレオチド糖）であり、Lは結合またはリンカーであり、R¹は修飾基、例えば、ポリマー修飾部分である]を有する修飾糖アミンを使用する。代表的な結合は、グリコシル部分でのNH₂部分と修飾基での相補的反応性の基との間に形成されるものである。例えば、R¹がカルボン酸部分を含む場合、この部分は活性化され、グリコシル残基でのNH₂部分と結合され、構造NHC(O)R¹を有する結合を与える。Jは、好ましくは、ピラノースまたはフラノース構造を開裂する条件、例えば、酸化的条件、例えば、過ヨウ素酸ナトリウムにさらされることによって分解されていない、「無傷」であるグリコシル部分である。

30

【0099】

代表的なリンカーとしてはアルキルおよびヘテロアルキル部分が挙げられる。リンカーとしては、連結基、例えば、アシルベースの連結基、例えば、-C(O)NH-、-OC(O)NH-などが挙げられる。連結基は、本発明の種の成分間、例えば、グリコシル部分とリンカー(L)との間、またはリンカーと修飾基(R¹)との間に形成された結合である。他の代表的な連結基はエーテル、チオエーテル、およびアミンである。例えば、1つの実施形態において、リンカーは、グリシン残基などのアミノ酸残基である。グリシンのカルボン酸部分は、グリコシル残基でのアミンとの反応によって対応するアミドへ変換され、グリシンのアミンは修飾基の活性化カルボン酸または炭酸塩との反応によって対応するアミドまたはウレタンへ変換される。

40

【0100】

別の代表的なリンカーはPEG部分、例えば、アミノ酸残基で官能化されるPEG部分である。PEGリンカーは、1つのPEG末端でアミノ酸残基によりグリコシル基にコンジュゲートされ、かつ他のPEG末端によりR¹に結合されている。あるいは、アミノ酸残基はR¹に結合され、アミノ酸に結合されていないPEG末端はグリコシル基に結合されている。

50

【0101】

NH - L - R¹ の代表的な種は式 :

- NH { C (O) (CH₂)_a NH }_s { C (O) (CH₂)_b (OCH₂CH₂)_c O (CH₂)_d NH }_t R¹ [式中、指数 s および t は独立して 0 または 1 である。指数 a、b、および d は独立して 0 ~ 20 の整数であり、c は 1 ~ 2500 の整数である] を有する。他の同様のリンカーは、- NH 部分が別の基、例えば、- S、- O、または - CH₂ によって置換される種に基づく。当業者であれば十分に理解するように、指数 s および t に対応する 1 つもしくはそれ以上の括弧付き部分は、置換もしくは非置換アルキル、もしくはヘテロアルキル部分で置換されうる。

【0102】

10

より詳しくは、本発明では、NH - L - R¹ が、NH C (O) (CH₂)_a NH C (O) (CH₂)_b (OCH₂CH₂)_c O (CH₂)_d NHR¹、NH C (O) (CH₂)_b (OCH₂CH₂)_c O (CH₂)_d NHR¹、NH C (O) O (CH₂)_b (OCH₂CH₂)_c O (CH₂)_d NHR¹、NH (CH₂)_a NH C (O) (CH₂)_b (OCH₂CH₂)_c O (CH₂)_d NHR¹、NH C (O) (CH₂)_a NHR¹、NH C (CH₂)_a NHR¹、および NHR¹ である化合物が使用される。これらの式において、指数 a、b、および d は、0 ~ 20、好ましくは、1 ~ 5 の整数から独立して選択される。指数 c は 1 ~ 約 2500 の整数である。

【0103】

20

代表的な実施形態において、c は、PEG 部分がおよそ 1 kDa、2 kDa、5 kDa、10 kDa、15 kDa、20 kDa、25 kDa、30 kDa、35 kDa、40 kDa、45 kDa、50 kDa、55 kDa、60 kDa、65 kDa、70 kDa、75 kDa、または 80 kDa であるように選択される。

【0104】

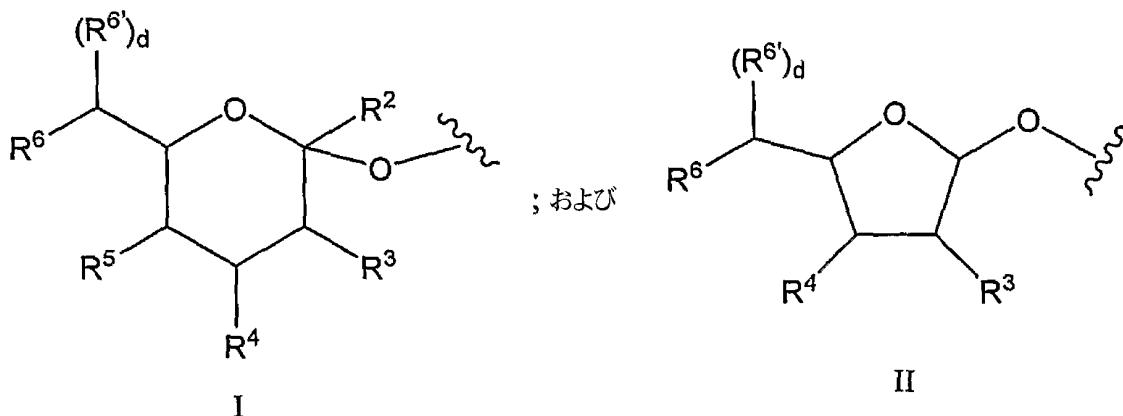
次の議論において、本発明は、フラノースおよびピラノースの選択誘導体の使用を参照することにより説明される。当業者は、議論の焦点が説明の明確さであり、かつ記載されている構造および組成物がサッカリド基、修飾サッカリド基、活性化修飾サッカリド基、および修飾サッカリド基のコンジュゲートの属にわたって一般に適用可能であることを認識するであろう。

【0105】

30

代表的な実施形態において、本発明は、

【化10】



から選択される式を有する無傷グリコシル連結基によりポリマー修飾部分にコンジュゲートされている糖ペプチドを提供する。式 Iにおいて、R² は H、CH₂OR⁷、COOR⁷、または OR⁷ であり、ここで R⁷ は H、置換もしくは非置換アルキル、または置換もしくは非置換ヘテロアルキルを表す。COOR⁷ がカルボン酸またはカルボン酸塩である場合、両形態は単一構造の COO⁻ または COOH の指定によって表される。式 I および

50

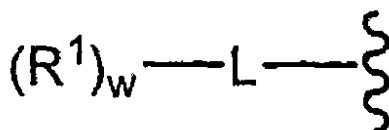
IIにおいて、記号 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、および R^6' は独立してH、置換もしくは非置換アルキル、OR⁸、NHC(O)R⁹を表す。指数dは0または1である。 R^8 および R^9 は独立してH、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、シアル酸、またはポリシアル酸から選択される。 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、および R^6' の少なくとも1つは、ポリマー修飾部分、例えば、結合または連結基により連結されたPEGを含む。代表的な実施形態において、 R^6 および R^6' は、それらが結合される炭素といっしょにシアル酸のピルビル側鎖の成分である。さらに代表的な実施形態において、この側鎖はポリマー修飾部分で官能化されている。別の代表的な実施形態において、 R^6 および R^6' は、それらが結合される炭素といっしょにシアル酸の側鎖の成分であり、ポリマー修飾部分は R^5 の成分である。

10

【0106】

さらに代表的な実施形態において、ポリマー修飾部分は、一般にヘテロ原子、例えば、窒素により、以下の式

【化11】



20

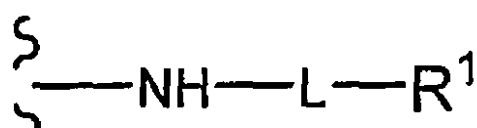
[式中、 R^1 はポリマー部分であり、Lは結合および連結基から選択される。指数wは、1 - 6、好ましくは、1 - 3、かつより好ましくは、1 - 2から選択される整数を表す]に示される通り、リンカー、Lによりコア上で糖コアに結合される。代表的な連結基は、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル部分およびシアル酸を含む。リンカーの代表的な成分がアシル部分である。

【0107】

本発明による代表的な化合物は、式IまたはIIによる構造を有し、ここで R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、または R^6' の少なくとも1つは式

【化12】

30



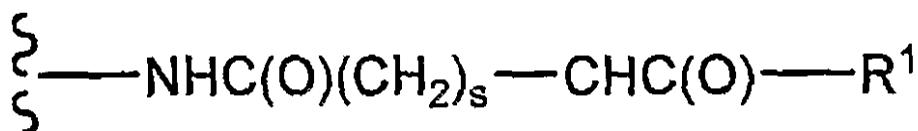
を有する。

【0108】

本実施形態に記載の別の実施例において、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、または R^6' の少なくとも1つは式

【化13】

40



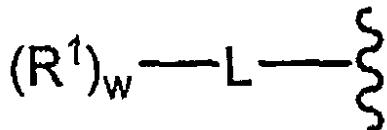
[式中、sは0 ~ 20の整数であり、 R^1 は線状ポリマー修飾部分である]を有する。

50

【0109】

代表的な実施形態において、ポリマー修飾部分 - リンカー構成物は、中心部分に結合した2つもしくはそれ以上のポリマー鎖を含む分岐構造である。本実施形態において、構成物は式

【化14】



10

[式中、 R^1 および L は上記の通りであり、 w' が 2 ~ 6、好ましくは、2 ~ 4、かつより好ましくは、2 ~ 3 の整数である] を有する。

【0110】

L が結合である場合、これは R^1 の前駆体上の反応官能基とサッカリールコア上の相補的反応性の反応官能基との間に形成される。 L がゼロ順位リンカーである場合、 L の前駆体は R^1 前駆体との反応前にグリコシル部分上の適所にありうる。あるいは、 R^1 および L の前駆体は、その後にグリコシル部分に結合される前もって作られたカセットへ組込まれうる。本明細書に記載されているように、適切な反応官能基を有する前駆体の選択および調製は当業者の能力の範囲内である。さらに、前駆体の結合は、当技術分野で十分に理解されている化学によって進行する。

20

【0111】

代表的な実施形態において、 L は、アミノ酸、または、ポリマー修飾部分が置換アルキルリンカーにより結合されている修飾糖を提供する小さなペプチド（例えば、1 - 4 アミノ酸残基）から形成される連結基である。代表的なリンカーとしては、グリシン、リシン、セリン、およびシステインが挙げられる。PEG 部分は、アミドまたはウレタン結合によりリンカーのアミン部分に結合されうる。PEG は、それぞれ、チオエーテルまたはエーテル結合によりシステインおよびセリンのイオウまたは酸素原子に連結される。

【0112】

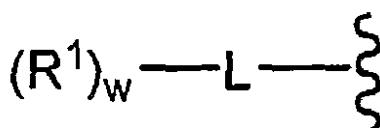
代表的な実施形態において、 R^5 はポリマー修飾部分を含む。別の代表的な実施形態において、 R^5 は、ポリマー修飾部分、および修飾部分を分子の残りの部分に結合するリンカー、 L を含む。上記の通り、 L は線状または分岐構造でありうる。同様に、ポリマー修飾部分は分岐または線状でありうる。

30

【0113】

代表的な実施形態において、

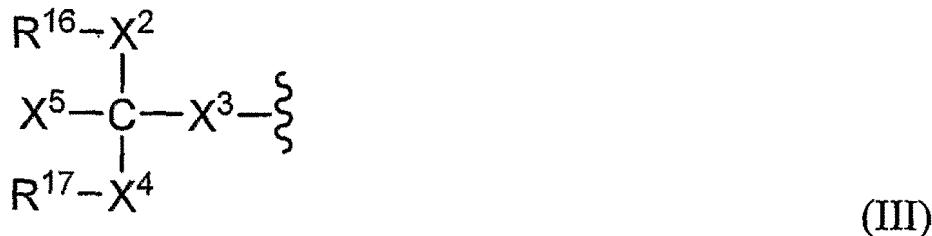
【化15】



40

は次式

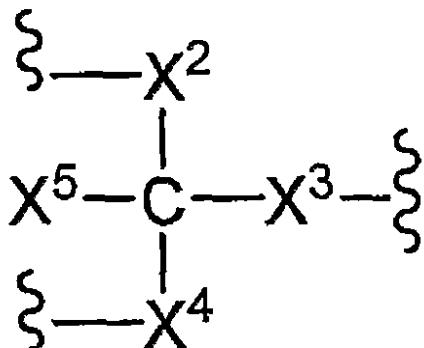
【化16】



[式中、部分

10

【化17】



20

はリンカー腕、L、であり、R¹⁶およびR¹⁷はR¹である。R¹⁶およびR¹⁷は独立してポリマー修飾部分から選択される。Cは炭素である。X⁵は、好ましくは、非反応基（例えば、H、非置換アルキル、非置換ヘテロアルキル）であり、ポリマー腕でありうる。X²およびX⁴は、好ましくは、同じまたは異なりうる、生理的条件下に非反応であるリンケージ断片である。代表的なリンカーは、芳香族もエステル部分も含まない。あるいは、これらのリンケージは、生理的に関連性の条件下に分解するようにデザインされている1つもしくはそれ以上の部分、例えば、エステル、ジスフィルド等を含みうる。X²およびX⁴はポリマー腕R¹⁶およびR¹⁷をCに結合させる。X²、X³、およびX⁴の代表的なリンケージ断片は独立して選択され、S、SC(O)NH、HNC(O)S、SC(O)O、O、NH、NHC(O)、(O)CNH、およびNHC(O)O、およびOC(O)NH、CH₂S、CH₂O、CH₂CH₂O、CH₂CH₂S、(CH₂)₀、(CH₂)₀Sまたは(CH₂)₀Y'-PEGを含み、ここでY'はS、NH、NHC(O)、C(O)NH、NHC(O)O、OC(O)NH、またはOであり、oは1～50の整数である。代表的な実施形態において、リンケージ断片X²およびX⁴は異なるリンケージ断片である]による構造を有する。

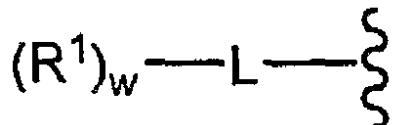
30

【0114】

代表的な実施形態において、

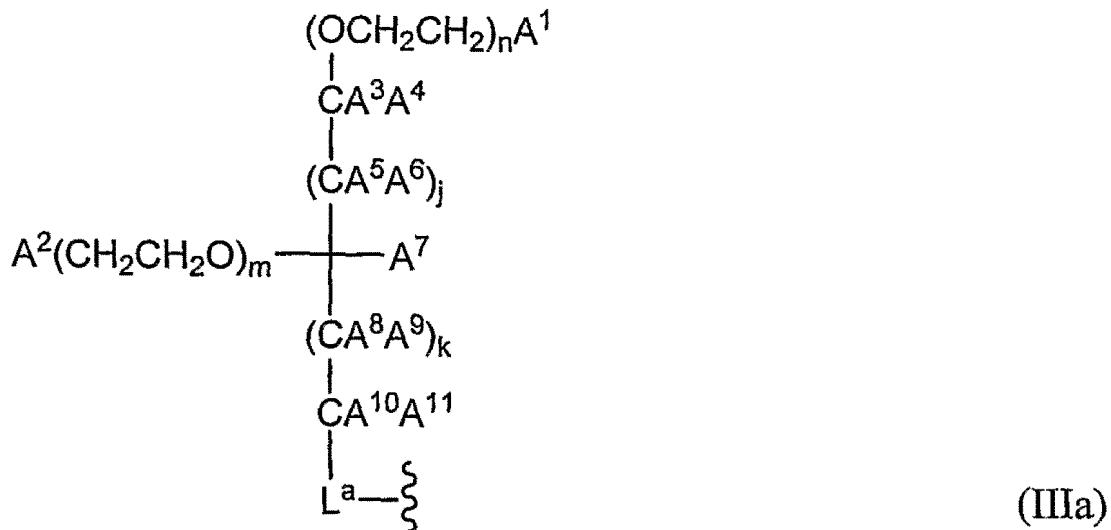
40

【化18】



は次式

【化19】



[指数mおよびnは、独立して0～5000から選択される整数である。A¹、A²、A³、A⁴、A⁵、A⁶、A⁷、A⁸、A⁹、A¹⁰、およびA¹¹は、H、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、-NA¹²A¹³、-OA¹²、および-SiA¹²A¹³から独立して選択されるメンバである。指数jおよびkは、0～20から独立して選択される整数である。A¹²およびA¹³は、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロアリール、および置換もしくは非置換ヘテロアリールから独立して選択されるメンバである]による構造を有する。

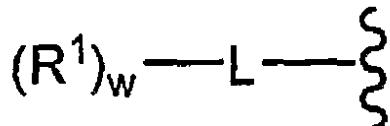
【0115】

式IIIaは式IIIのサブセットである。式IIIaによって記載された構造は式IIIによっても包含される。

【0116】

代表的な実施形態において、

【化20】



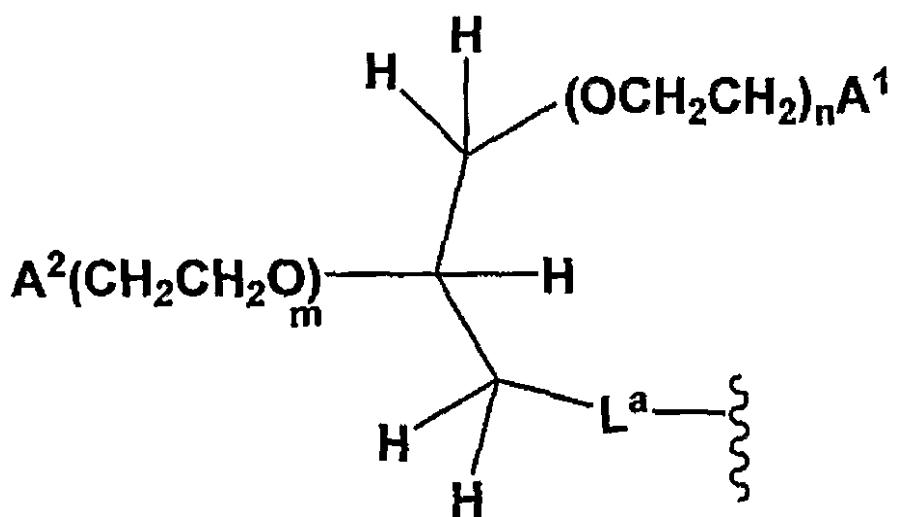
20

30

40

は次式

【化 2 1】



10

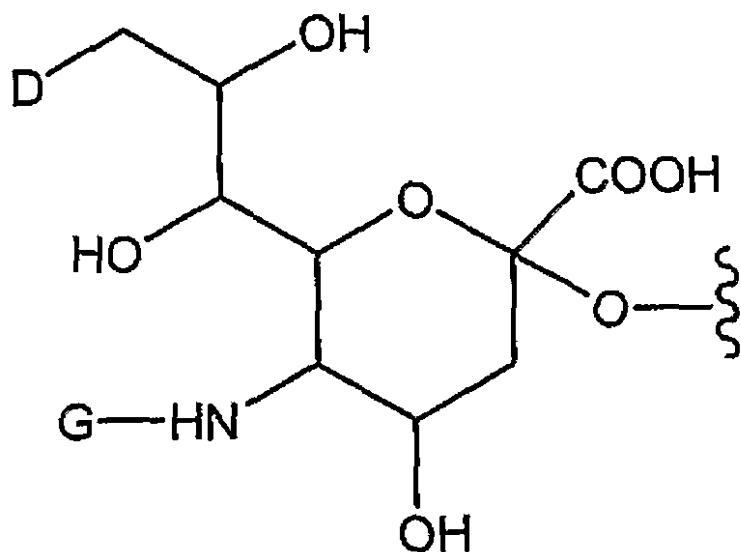
[代表的な実施形態において、A¹ および A² は各々 - OCH₃ または H である] による構造を有する。

20

【 0 1 1 7 】

1 つの実施形態において、本発明は、部分

【化 2 2】



30

40

[式中、D は - OH および R¹ - L - HN - から選択されるメンバーであり、G は H および R¹ - L - および - C (O) (C₁ - C₆) アルキルから選択されるメンバーであり、R¹ は直鎖 - 鎖または分岐ポリ (エチレングリコール) 残基を含んで成る部分であり、L はリンカー、例えば、結合 (「ゼロ順位」)、置換もしくは非置換アルキル、および置換もしくは非置換ヘテロアルキルである。代表的な実施形態において、D が OH である場合、G は R¹ - L - であり、G が - C (O) (C₁ - C₆) アルキルである場合、D は R¹ - L - NH - である] を含んで成る G - C S F ペプチドを提供する。

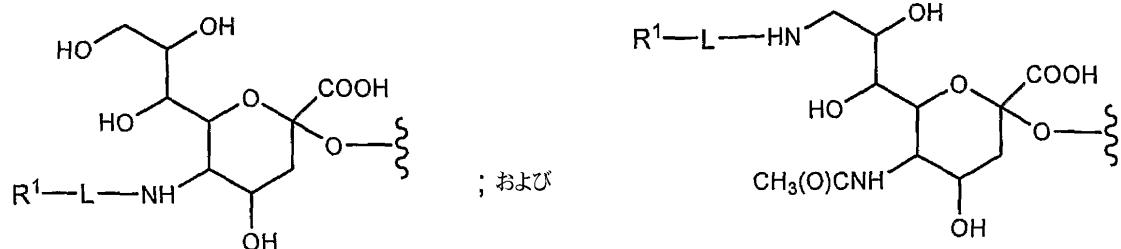
【 0 1 1 8 】

別の代表的な実施形態において、本発明は、本発明の修飾糖と基質 G - C S F ペプチド

50

との間に形成されるコンジュゲートを提供する。本実施形態において、修飾糖の糖部分は、ペプチド基質と修飾基との間に挿入されたグリコシル連結基になる。代表的なグリコシル連結基が無傷グリコシル連結基であるが、ここで連結基を形成するグリコシル部分は、化学的（例えば、メタ過ヨウ素酸ナトリウム）または酵素的（例えば、オキシダーゼ）方法によって分解されない。本発明の選択コンジュゲートは、アミノ-サッカリド、例えば、マンノサミン、グルコサミン、ガラクトサミン、シアル酸等のアミン部分に結合されている修飾基を含む。本モチーフに記載の代表的な修飾基-無傷グリコシル連結基カセットは、式

【化23】



を有するものなどのシアル酸構造に基づく。

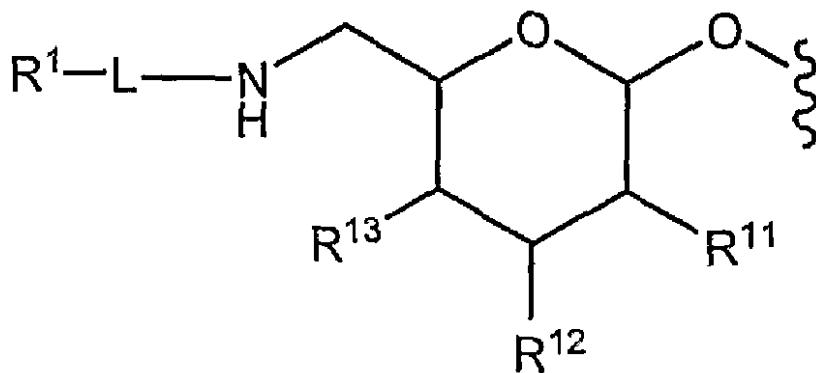
【0119】

上式において、R¹およびLは上記の通りである。代表的なR¹基の構造に関する詳細が以下に示されている。

【0120】

さらに代表的な実施形態において、コンジュゲートは、基質G-CSFとサッカリール部分との間に形成されるが、ここで修飾基はリンカーによりサッカリール部分の6炭素位置で結合されている。したがって、本実施形態に記載の例示的なコンジュゲートは式

【化24】



【式中、ラジカルは上記の通りである】を有する。かかるサッカリール部分は、グルコース、グルコサミン、N-アセチル-グルコサミン、ガラクトース、ガラクトサミン、N-アセチル-ガラクトサミン、マンノース、マンノサミン、N-アセチル-マンノサミンなどが挙げられるが、これらに限定されない。

【0121】

G-CSFなど治療的ペプチド上の修飾グリコシル残基に利用可能な方法の多用途性により、本発明のペプチドコンジュゲート上のグリコシル構造は実質的に任意の構造を有する。さらに、グリカンはO連結またはN連結でありうる。下記で例示される通り、上記のピラノースおよびフラノース誘導体の各々がペプチドのグリコシル部分の成分でありうる。

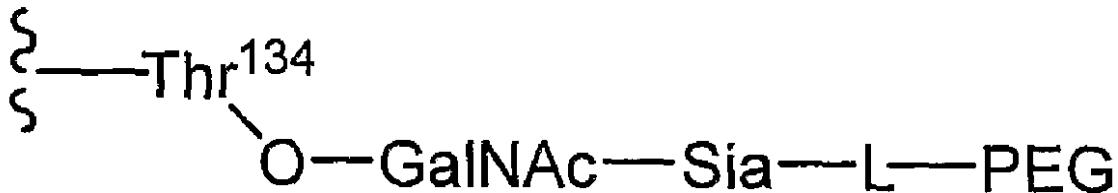
30

40

50

【0122】

別の代表的な実施形態において、本発明はG-CSFペプチドコンジュゲートを提供するが、ここで修飾グリコシリル残基（グリコシリル連結基を含む）はThr¹³³にある（配列がMetで始まる場合はThr¹³⁴）。本実施形態に記載の代表的な式は部分
【化25】

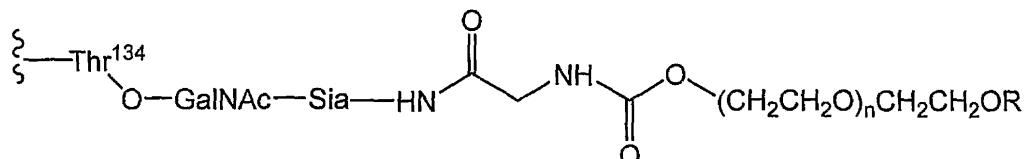


[式中、Lは、0順位リンカー、置換もしくは非置換アルキル、および置換もしくは非置換ヘテロアルキル部分であるリンカーである。代表的なリンカーが天然または非天然アミノ酸のアミドまたはカルバメートである（例えば、-C(O)(CH₂)_sNHC(O)-）が、ここで指数sは1～20の整数を表す。ポリ（エチレングリコール）（PEG）部分は、約100kDaまでの分子量を有しうる。代表的なPEG部分はほぼ1kDa、2kDa、5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa、30kDa、35kDa、40kDa、45kDa、50kDa、55kDa、60kDa、65kDa、70kDa、75kDa、または80kDaである。PEG部分は、本明細書に記載のものなど線状または分岐PEG種である。リンカーに結合されていないPEG部分の末端は、OHまたは別の部分のいずれか、例えば、O-(C₁-C₄)置換もしくは非置換アルキル基でありうる。OMEが現在、好ましい。]を含む。

【0123】

さらに代表的な実施形態において、本発明の糖PEG化G-CSFは基礎構造

【化26】



[式中、Rおよびnは上記の通りである]を含む。リンカー腕-PEG力セットは任意の位置でシアル酸に結合されている。炭素5での窒素は現在、好ましいが、炭素9でのヒドロキシルはアミンで置換され、上記の通り官能化されうる。

【0124】

上記の図式の各々において、グリコシリ化部位は位置134でのトレオニンとして表される。図式は、末端のメチオニンを含むG-CSFペプチドに関する。図式は、末端のメチオニンを含むことがないG-CSFペプチドにも関するが、この場合、上記図式の各々Thrは適切にThr¹³³と標識される。

【0125】

本発明は、式

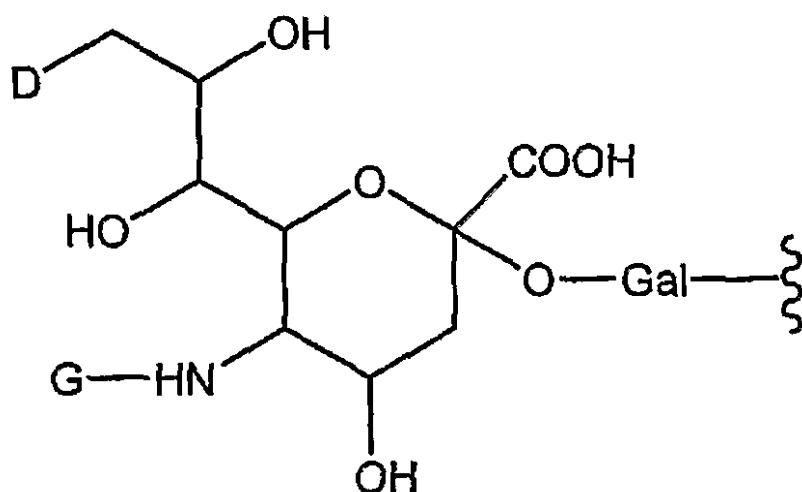
10

20

30

40

【化27】



10

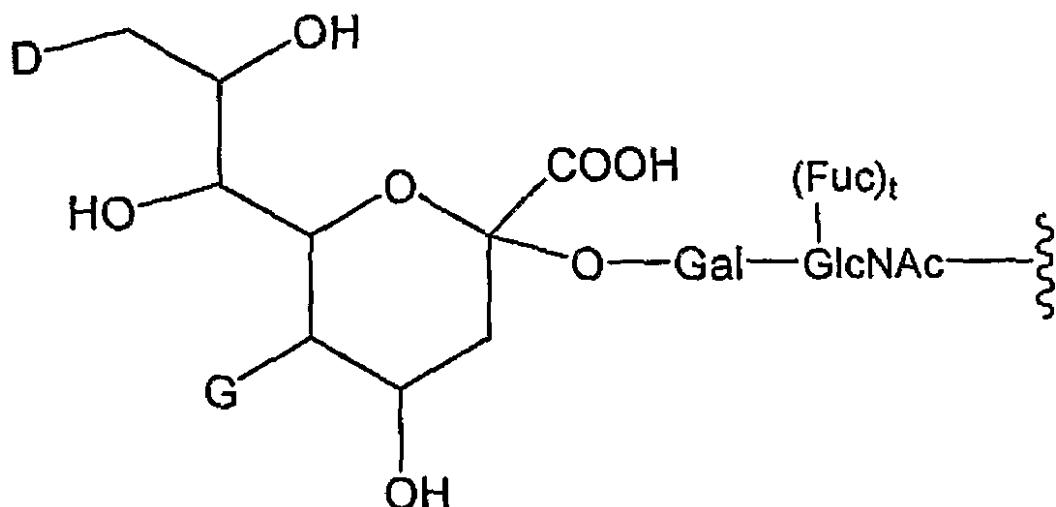
を有するグリコシリル基を含む修飾G-CSFペプチドを提供する。

【0126】

20

他の実施形態において、基は式

【化28】



30

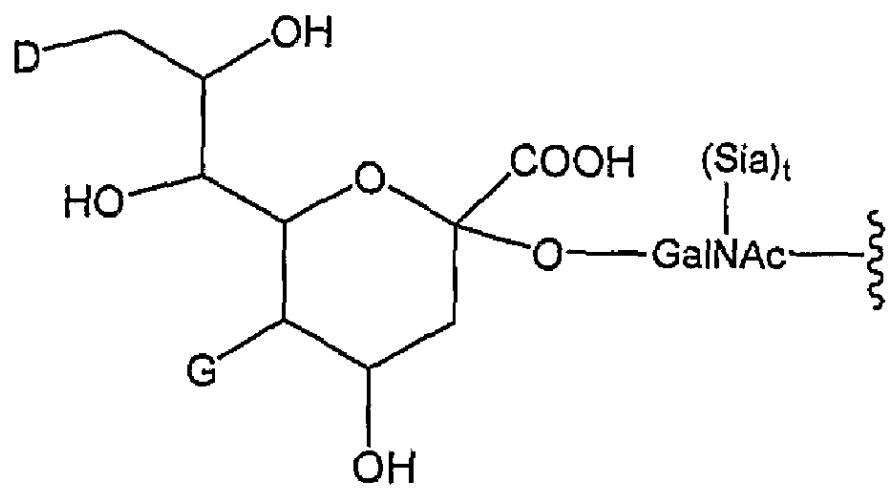
[式中、指數tは0または1である]を有する。

【0127】

40

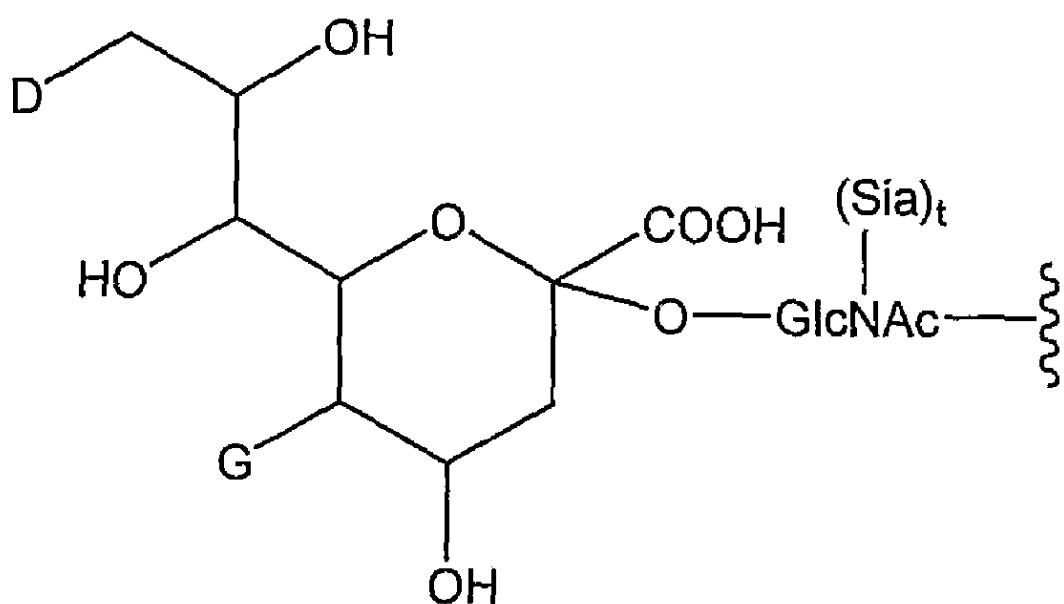
さらに代表的な実施形態において、基は次式

【化29】



10

および



20

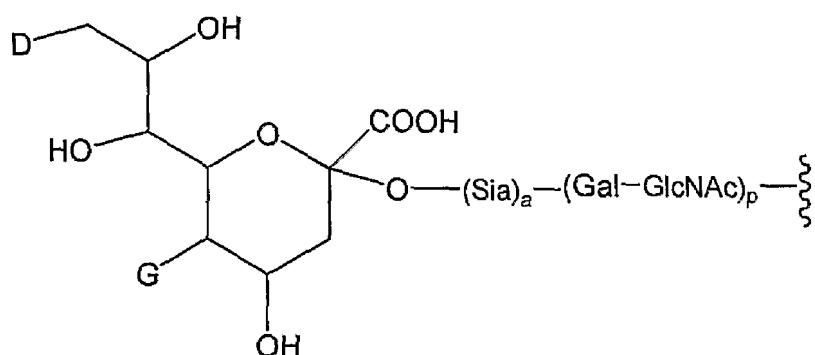
30

[式中、指数tは0または1である]から選択されるメンバーである構造を有する。

【0128】

さらに別の実施形態において、基は式

【化30】



40

50

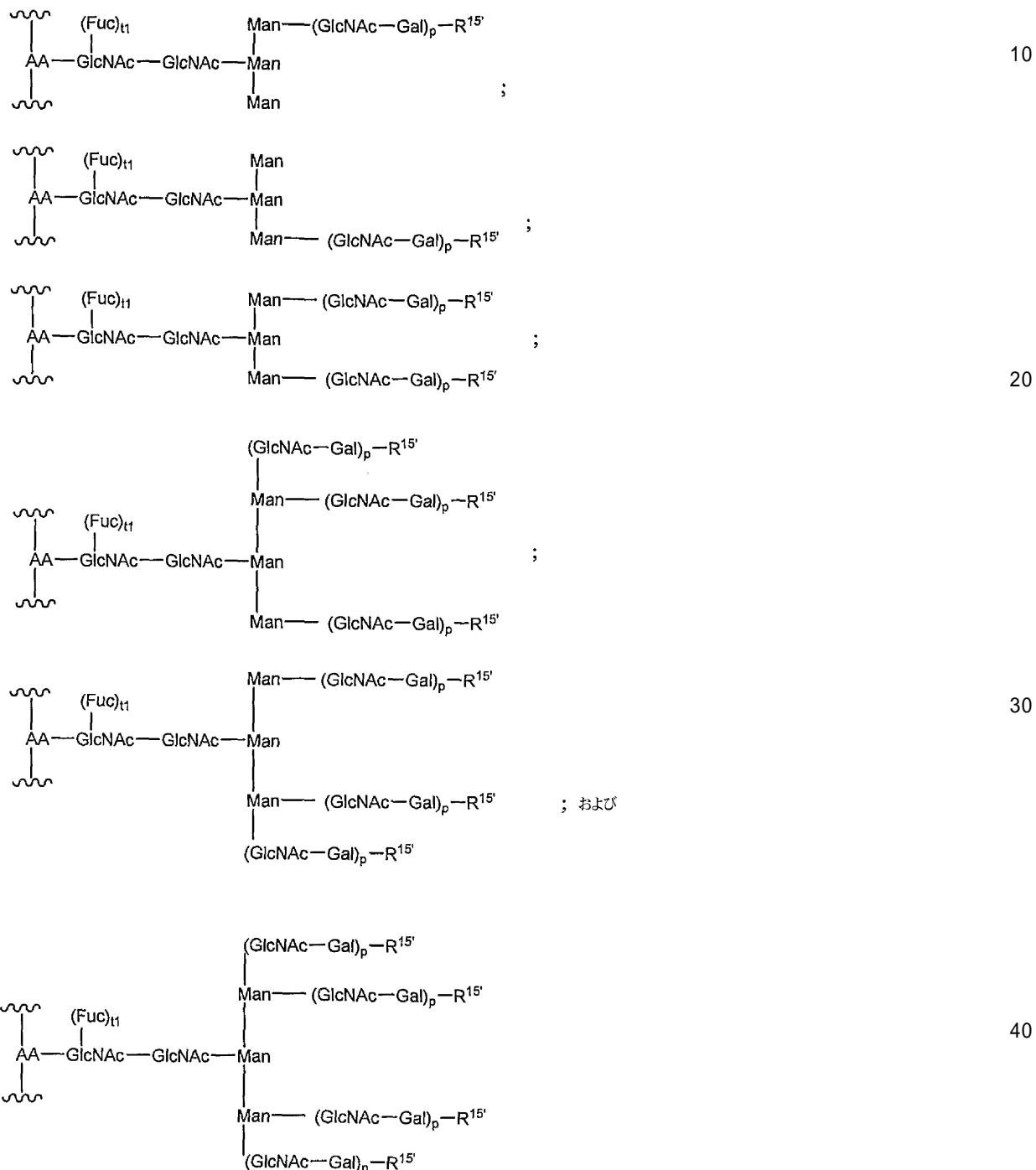
[式中、指数 p は 1 ~ 10 の整数を表し、a は 0 または 1 のいずれかである] を有する。

【0129】

上記の式の各々に記載の代表的な実施形態において、PEG グリコシル連結基は G - C SF の Th r 133 (Th r 134) で結合されている。

【0130】

代表的な実施形態において、本発明の糖PEG化G-CSFペプチドは、下記
【化31】



のグリコシル残基から選択される少なくとも 1 つの N - 連結グリコシル残基を含む。

【0131】

上式において、指数 t 1 は 0 または 1 であり、指数 p は 1 ~ 10 の整数である。記号 R^{15'} は、H、OH (例えば、Gal-OH)、シアリル部分、ポリマー修飾シアリル部分 (すなわち、グリコシル連結基 - ポリマー修飾部分 (Sia-L-R¹)) またはポリ

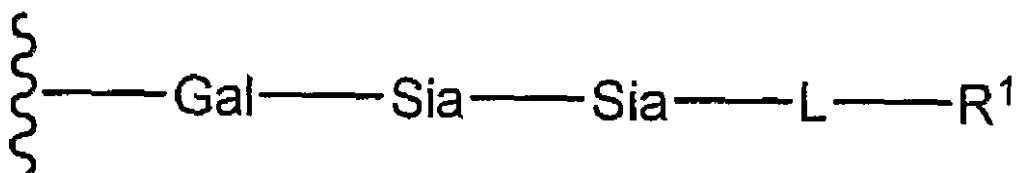
マー修飾シアリル部分に結合しているシアリル部分（例えば、Sia - Sia - L - R¹）（「Sia - Sia^P」）。代表的なポリマー修飾サッカリール部分は式IおよびIIに記載の構造を有する。本発明の代表的なG-CSFペプチドは、式IまたはIIに記載の構造を含むR^{15'}を有する少なくとも1つのグリカンを含む。式IおよびIIの開放価を有する酸素は、好ましくは、グリコシリリンケージによりGalまたはGalNAc部分の炭素に結合されている。さらに代表的な実施形態において、酸素はガラクトース残基の位置3で炭素に結合されている。代表的な実施形態において、修飾シアリル酸は2,3でガラクトース残基に連結されている。別の代表的な実施形態において、シアリ酸は2,6でガラクトース残基に連結されている。

【0132】

10

別の代表的な実施形態において、本発明は、ペプチドのアミノ酸残基に共有結合されている上記のものなどグリコシリル連結基を含むG-CSFペプチドコンジュゲートを提供する。本モチーフによる1つの実施形態において、グリコシリル連結部分は、Sia残基によりガラクトース残基に連結されている。

【化32】



20

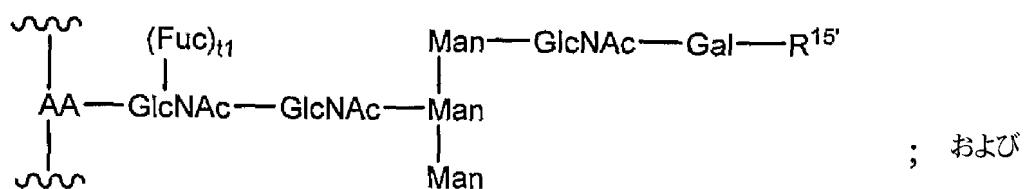
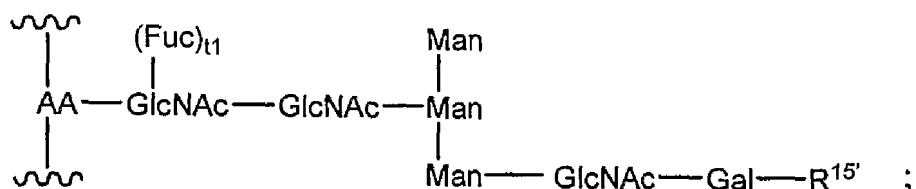
本モチーフによる代表的な種が、Sia - Sia結合形成する酵素、例えば、CST-I、ST8Sia-I、ST8Sia-II、およびST8Sia-IVを使用することにより、Sia - L - R¹をグリカンの末端のシアリ酸にコンジュゲートすることによって調製される。

【0133】

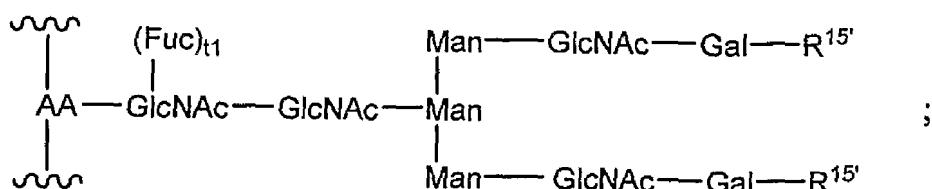
別の代表的な実施形態において、グリカンは基

【化33】

30



40



50

およびその組合せから選択される式を有する。

【0134】

本基のグリカンは一般に昆虫（例えば、Sf-9）細胞によって、本明細書に記載された方法による再構築後に生成されるG-CSFペプチドで確認されるものに対応する。例えば、トリマンノシルコアで発現される昆虫由来G-CSFは、その後にGalNAcドナーとGalNAcトランスフェラーゼおよびGal1ドナーとGalトランスフェラーゼと接触される。GalNAcおよびGalのトリマンノシルコアへの付加は、2つのステップまたは単一のステップのいずれかで達成される。修飾シアル酸が、本明細書で論じるように、グリコシル部分の少なくとも1つの分岐に添加される。修飾シアル酸で官能化されていないGal部分は、場合により、シリルトランスフェラーゼの存在下にシアル酸ドナーとの反応によって「キャップ」される。

【0135】

代表的な実施形態において、ペプチドの集団における末端Gal部分の少なくとも60%はシアル酸でキャップされ、好ましくは、少なくとも70%、より好ましくは、少なくとも80%、さらにより好ましくは、少なくとも90%、かつさらにより好ましくは、少なくとも95%、96%、97%、98%、または99%はシアル酸でキャップされる。

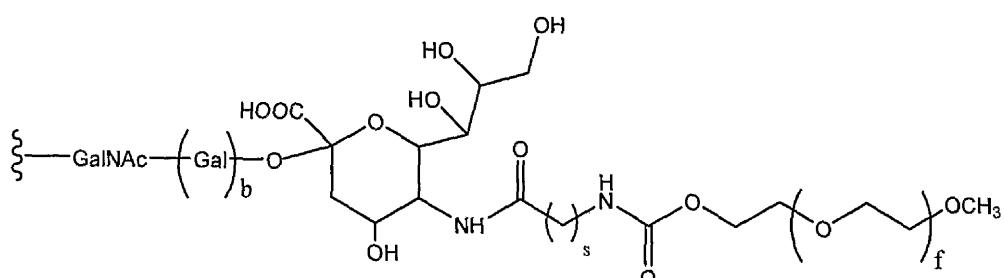
【0136】

上式の各々において、R¹～⁵は上記の通りである。本発明のさらに代表的な修飾G-CSFペプチドは、式IまたはIIによる構造を有するR¹～⁵部分を有する少なくとも1つのグリカンを含む。

【0137】

代表的な実施形態において、グリコシル連結部分は式

【化34】



10

20

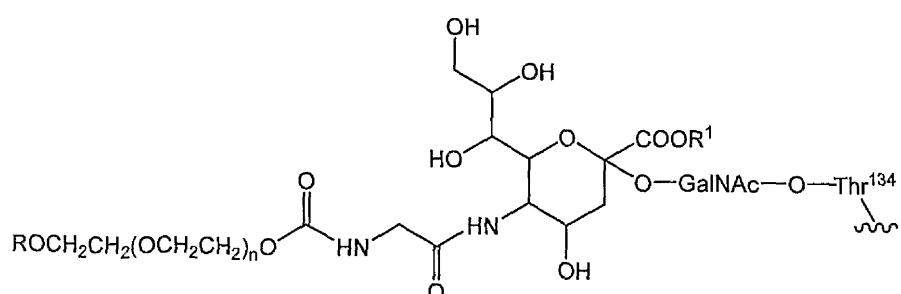
30

[式中、bは0または1である。指数sは1～10の整数を表し、fは1～2500の整数を表す]を有する。一般に、約20kDaの分子量を有するPEG部分の使用が好ましい。また、配列番号1の133でのトレオニンまたは配列番号2のトレオニン134へのグリコシル連結基の結合も好ましい。

【0138】

さらに別の代表的な実施形態において、本発明は、基礎構造

【化35】



40

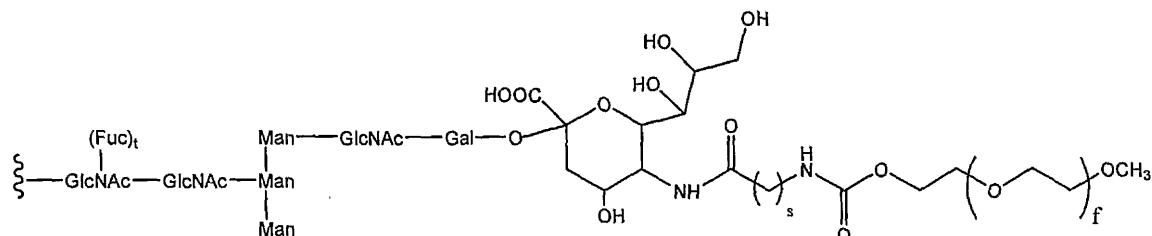
[式中、Rおよびnは上記の通りである。R¹はHまたは脱プロトン化酸の負電荷（すなわち、COO⁻）を表す]を含む糖PEG化GCSFを提供する。

50

【0139】

別の代表的な実施形態において、G-CSFは昆虫細胞由来であり、GlcNAcおよびGalをマンノースコアに添加することによって再構築され、線状PEG部分を有するシアル酸を使用することにより糖PEG化され、式

【化36】



[式中、sは1～10の整数を表し、fは1～2500の整数を表す]を有する少なくとも1つの部分を含んで成るG-CSFペプチドを与える。

【0140】

本明細書で論じるように、本発明のコンジュゲートにおいて使用されるPEGは線状または分岐でありうる。本発明の本実施形態による分岐コンジュゲートを形成するために使用する代表的な前駆体は式

【化37】

20



を有する。

30

【0141】

本式による分岐ポリマー種は基本的に純粋な水溶性ポリマーである。X³は、イオン性の、例えば、OH、COOH、H₂PO₄、HSO₃、HPO₃、およびその塩等、または他の反応官能基、例えば、下記を含む部分である。Cは炭素である。X⁵は、好ましくは、非反応基（例えば、H、非置換アルキル、非置換ヘテロアルキル）であり、ポリマー腕でありうる。R¹⁶およびR¹⁷は独立して選択されるポリマー腕、例えば、非ペプチド、非反応性ポリマー腕（例えば、PEG）である。X²およびX⁴は、好ましくは、同じまたは異なりうる生理的条件下に基本的に非反応性であるリンクエージ断片である。代表的なリンクエーは芳香族部分もエステル部分も含まない。あるいは、これらのリンクエージは、生理的に関連性のある条件下に分解するように考えられている1つもしくはそれ以上の部分、例えば、エステル、ジスルフィド等を含みうる。X²およびX⁴は、ポリマー腕R¹⁶およびR¹⁷をCに結合する。X³がリンクエー、糖、またはリンクエー-糖カセツトに対する相補的反応性の反応官能基と反応すると、X³はリンクエージ断片X³の成分に変換される。

40

【0142】

X²、X³、およびX⁴の代表的なリンクエージ断片は独立して選択され、S、SC(O)NH、HNC(O)S、SC(O)O、O、NH、NHC(O)、(O)CNH、およびNHC(O)O、およびOC(O)NH、CH₂S、CH₂O、CH₂CH₂O、CH₂CH₂S、(CH₂)₂O、(CH₂)₂Sまたは(CH₂)₂Y'-PEGを含み、ここでY'はS、NH、NHC(O)、C(O)NH、NHC(O)O、OC(O)NH

50

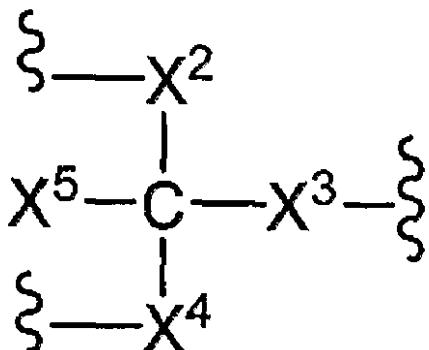
、または〇であり、〇は1～5〇の整数である。代表的な実施形態において、リンクエージ断片 X^2 および X^4 は異なるリンクエージ断片である。

【0143】

代表的な実施形態において、前駆体(III)、またはその活性化誘導体は、 X^3 と糖部分上の相補的反応性の基、例えば、アミンとの間の反応により糖、活性化糖、または糖ヌクレオチドと反応、かつそれによって、これらに結合される。あるいは、 X^3 は、リンクエージ、Lに対する前駆体上の反応官能基と反応する。式IおよびIIの R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、または R^6 の1つもしくはそれ以上が、分岐ポリマー修飾部分を含み、またはこの部分がLにより結合されうる。

【0144】

代表的な実施形態において、部分
【化38】



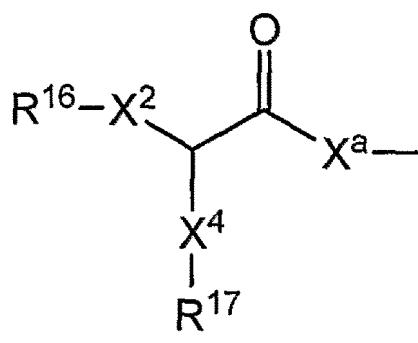
10

20

はリンクエージ、Lである。本実施形態において、代表的なリンクエージは、天然または非天然アミノ酸、アミノ酸類似体もしくはアミノ酸模倣剤、または1つもしくはそれ以上のかかる種から形成された小ペプチド由来である。例えば、本発明の化合物に存在するある分岐ポリマーは式

【化39】

30



(IV)

40

を有する。

【0145】

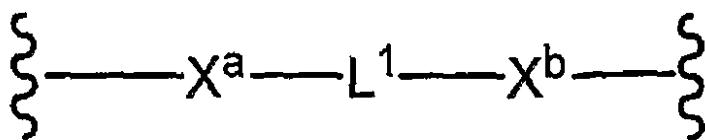
X^a は、分岐ポリマー修飾部分の前駆体、および糖部分での反応官能基、またはリンクエージへの前駆体に対する、反応官能基、例えば、 X^3 の反応によって形成されるリンクエージ断片である。例えば、 X^3 がカルボン酸である場合、これは活性化され、アミノ-サツカリドから懸垂するアミン基(例えば、Sia、GalNH₂、GlcNH₂、ManNH₂等)に直接結合され、アミドである X^a を形成する。追加の代表的な反応官能基および活性化前駆体は以下に記載されている。指数cは1～10の整数を表す。他の記号は上記のものと同一性を有する。

50

【0146】

別の代表的な実施形態において、 X^a は別のリンカー

【化40】



10

[式中、 X^b は第2のリング断片であり、 X^a について記載されている基から独立して選択され、かつ、 L と同様に、 L^1 は、結合、置換もしくは非置換アルキル、または置換もしくは非置換ヘテロアルキルである]で形成された連結部分である。

【0147】

X^a および X^b の代表的な種としては、S、SC(=O)NH、HNC(=O)S、SC(=O)O、O、NH、NHC(=O)、C(=O)NH および NHC(=O)O、および OC(=O)NH が挙げられる。

【0148】

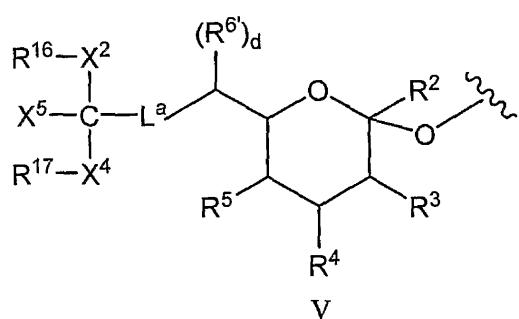
別の代表的な実施形態において、 X^4 は、アミノ酸、ジペプチド（例えば、Lys-Lys）、またはトリペプチド（例えば、Lys-Lys-Lys）である R^{1-7} に結合されたペプチドであり、ここでアルファ-アミン部分および/または側鎖ヘテロ原子はポリマー修飾部分で修飾される。

20

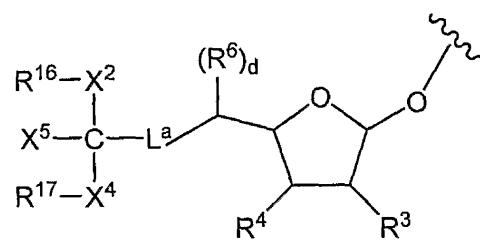
【0149】

さらに代表的な実施形態において、本発明のコンジュゲートは、部分、例えば、

【化41】

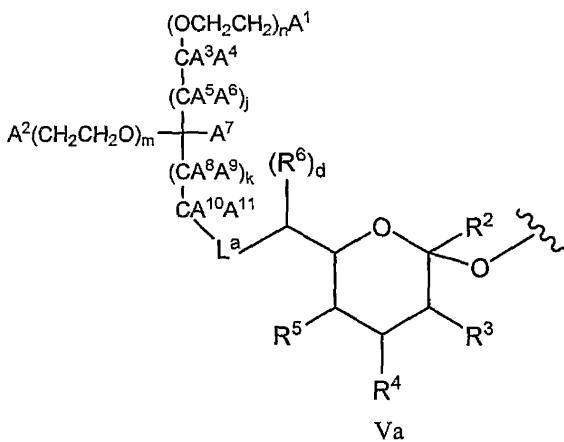


; および

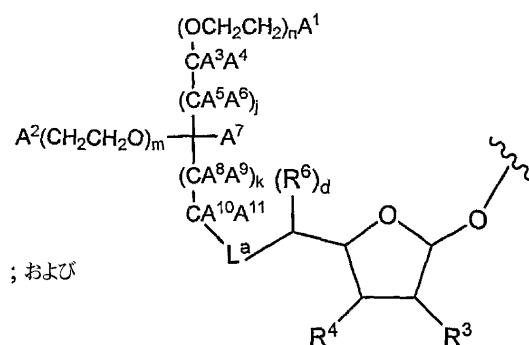


VI

30



; および



VIa

40

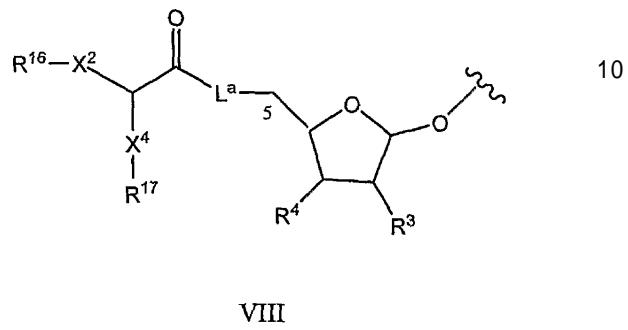
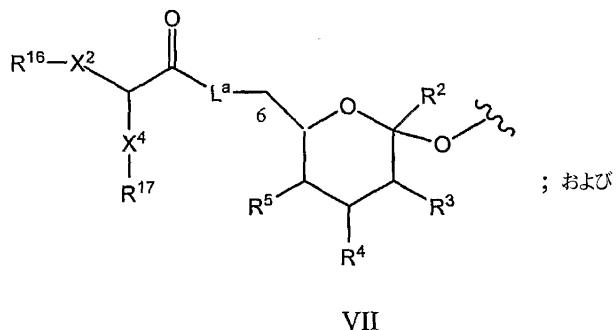
から選択される式 [式中、さまざまな記号によって表されるラジカルの同一性は、上記のものと同じである。 L^a は L および L^1 の上記の通り結合またはリンカーであり、例えば

50

、置換もしくは非置換アルキル、または置換もしくは非置換ヘテロアルキル部分である。代表的な実施形態において、 L^a は、示される通りポリマー修飾部分で官能化されているシアル酸の側鎖の部分である。代表的な L^a 部分は、1つもしくはそれ以上のOHまたはNH₂を含む置換もしくは非置換アルキル鎖を含む]を有するR^{1~5}部分である。

【0150】

さらに別の代表的な実施形態において、本発明は、部分、例えば、式
【化42】

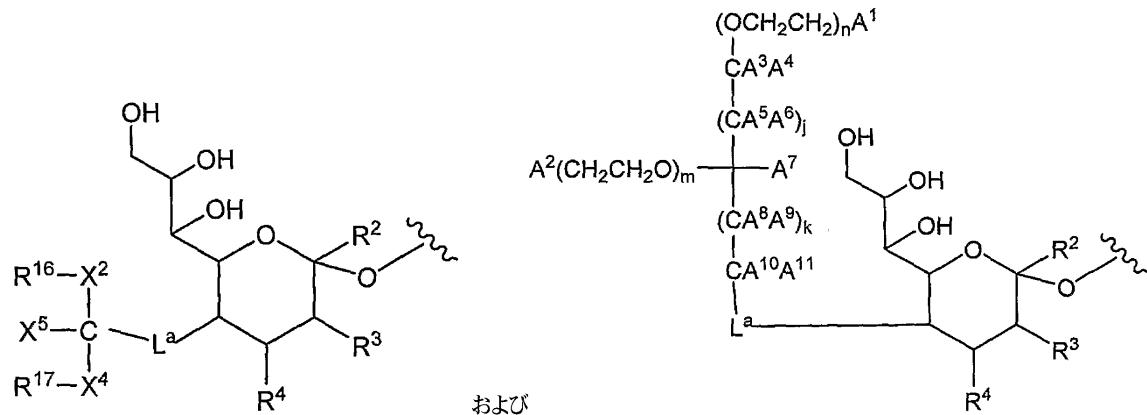


によるR^{1~5}部分を有するコンジュゲートを提供する。さまざまな記号によって表されるラジカルの同一性は、上記のものと同じである。当業者であれば、式VIIおよびVII
Iにおけるリンカーワークが同等に本明細書に記載の他の修飾糖に適用可能であることを十分
に理解するであろう。代表的な実施形態において、式VIIおよびVIIの種は、本明細書
に記載のグリカン構造に結合したR^{1~5}部分である。

【0151】

さらに別の代表的な実施形態において、G-CSFペプチドは式

【化43】



[式中、ラジカルの同一性は上記の通りである。 L^a の代表的な種は、- (CH₂)_j C(O) NH (CH₂)_h C(O) NH-であり、ここで指数hおよびjは0~10の独立して選択される整数である。さらに代表的な種が-C(O) NH-である。指数jおよびkは0~20の独立して選択される整数である。指数mおよびnは0~5000の独立して選択される整数である。A¹、A²、A³、A⁴、A⁵、A⁶、A⁷、A⁸、A⁹、A¹⁰、およびA¹¹は、H、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、-NA^{1~2}A^{1~3}、-OA^{1~2}、および-SiA^{1~2}A^{1~3}から独立して選択されるメンバーである。A^{1~2}およびA^{1~3}は、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、および置換もしくは非置換ヘテロアリールから独立して選択され

10

20

30

40

50

るメンバーである]によるR¹~⁵部分を含む。

【0152】

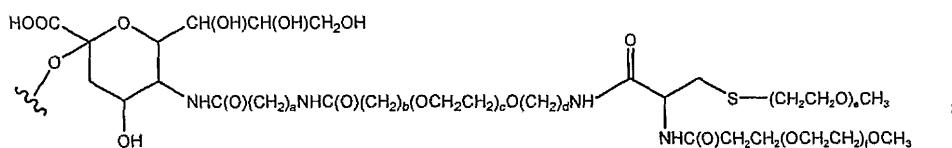
上記の本発明の実施形態は、さらに、ポリマーが水溶性ポリマー、詳しくは、ポリ(エチレングリコール)('PEG')、例えば、メトキシ-ポリ(エチレングリコール)である種を参照することにより例示される。当業者は、以下の焦点が説明の明確さのためであり、代表的なポリマーとしてPEGを使用する記載されたさまざまなモチーフが、PEG以外のポリマーが使用される種に同様に適用可能であることを十分に理解するであろう。

【0153】

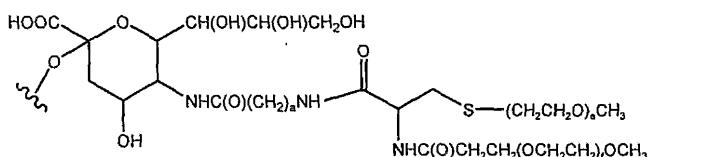
任意の分子量、例えば、1KDa、2KDa、5KDa、10KDa、15KDa、20KDa、25KDa、30KDa、35KDa、40KDa、45KDa、50KDa、55KDa、60KDa、65KDa、70KDa、75KDa、または80KDaのPEGが本発明において使用される。

【0154】

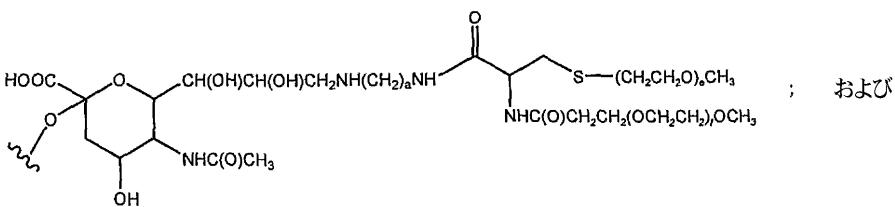
代表的な実施形態において、R¹~⁵部分は基化44】



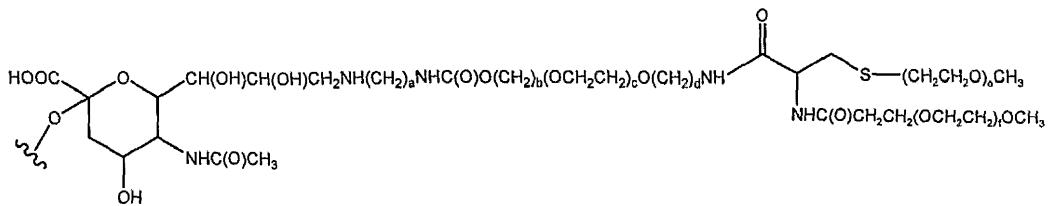
10



20



30



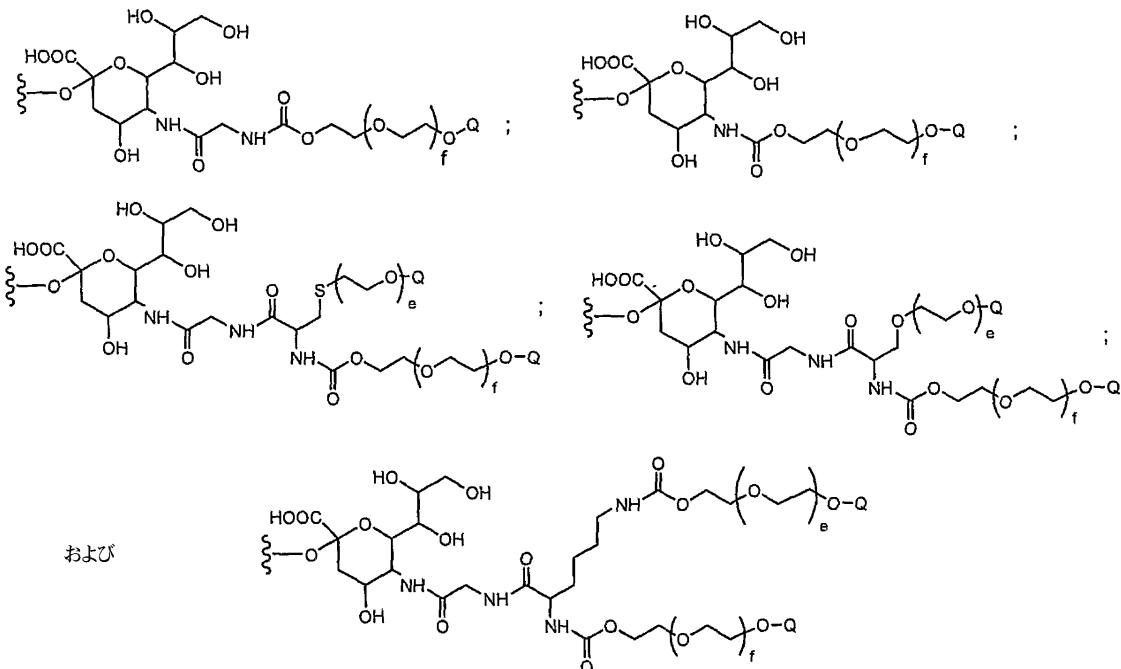
40

から選択されるメンバーである式を有する。上記構造の各々において、リンカー断片-NH-(CH₂)_a-は存在または非存在でありうる。

【0155】

他の代表的な実施形態において、コンジュゲートは基

【化45】



から選択される R^{1-5} 部分を含む。

【0156】

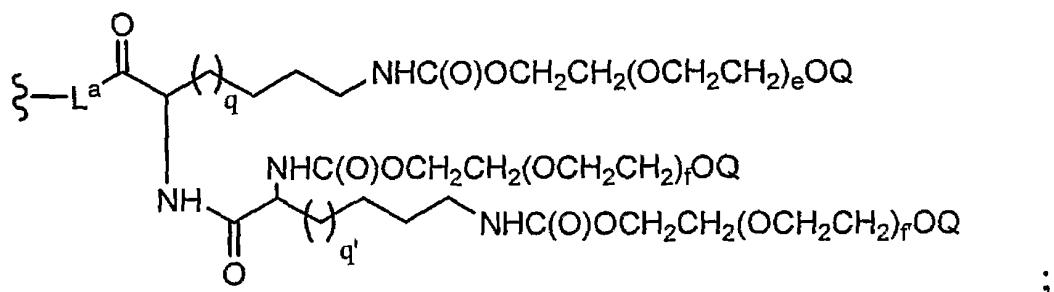
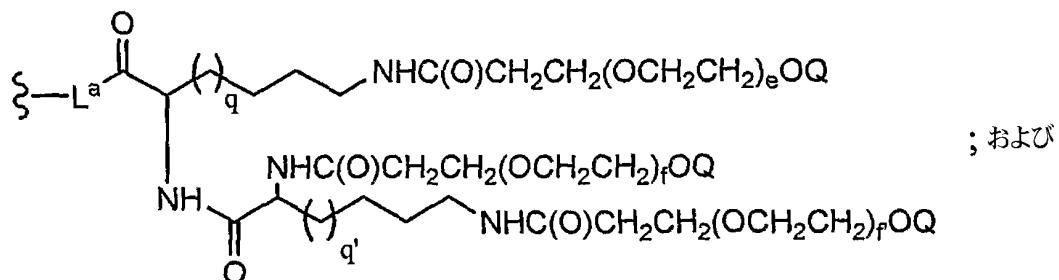
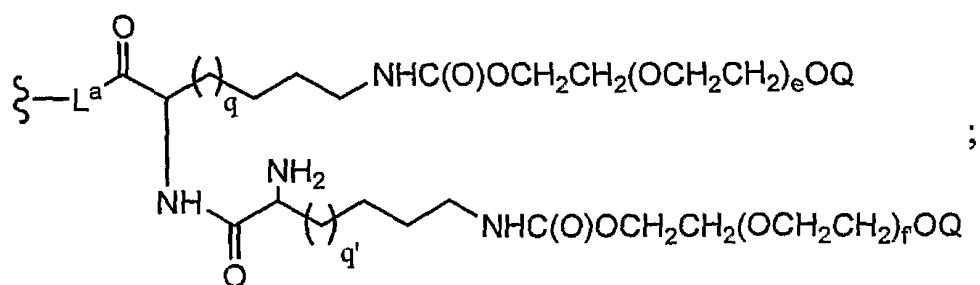
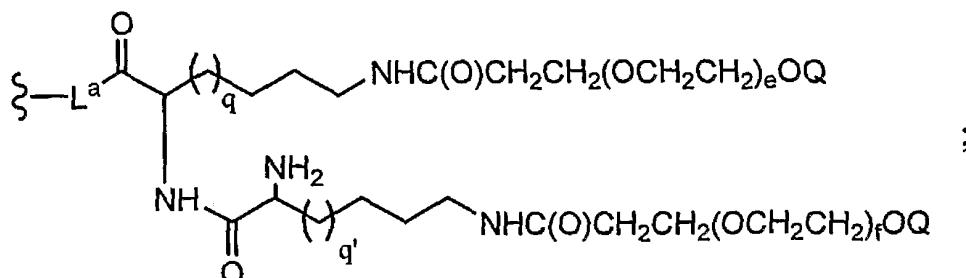
上式の各々において、指數 e および f は独立して 1 ~ 2500 の整数から選択される。さらに代表的な実施形態において、 e および f は、約 1 KDa、2 KDa、5 KDa、10 KDa、15 KDa、20 KDa、25 KDa、30 KDa、35 KDa、40 KDa、45 KDa、50 KDa、55 KDa、60 KDa、65 KDa、70 KDa、75 KDa、または 80 KDa である PEG 部分を提供するように選択される。記号 Q は、置換もしくは非置換アルキル（例えば、 C_1 - C_6 アルキル、例えば、メチル）、置換もしくは非置換ヘテロアルキルまたは H を表す。

【0157】

他の分岐ポリマーは、ジ - リシン (Lys - Lys) ペプチド、例えば、

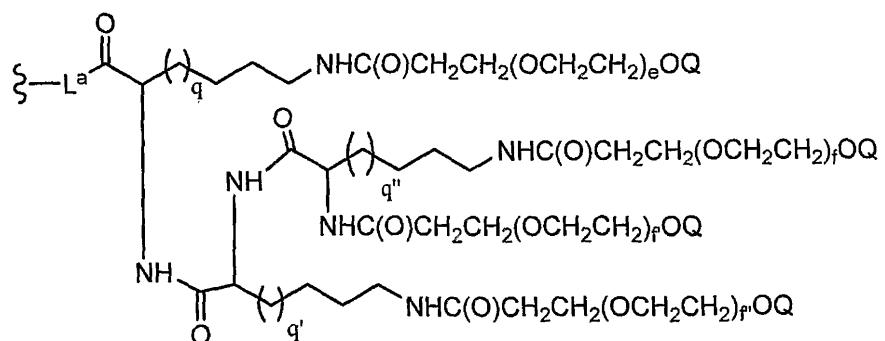
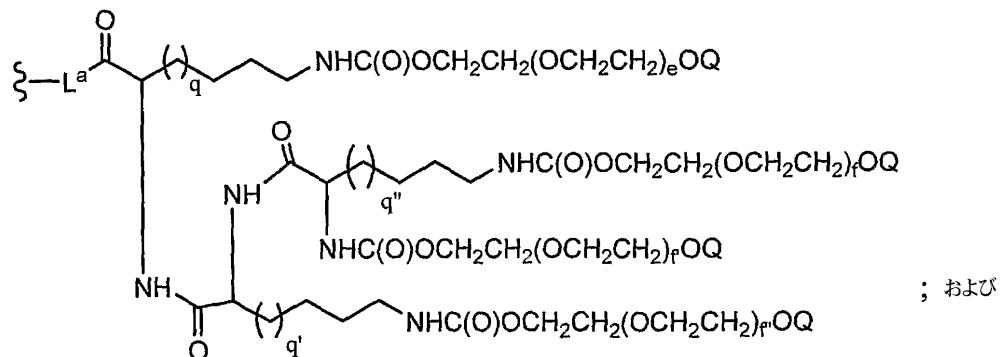
30

【化46】



およびトリ-リシン (Lys-Lys-Lys)、例えば、

【化47】

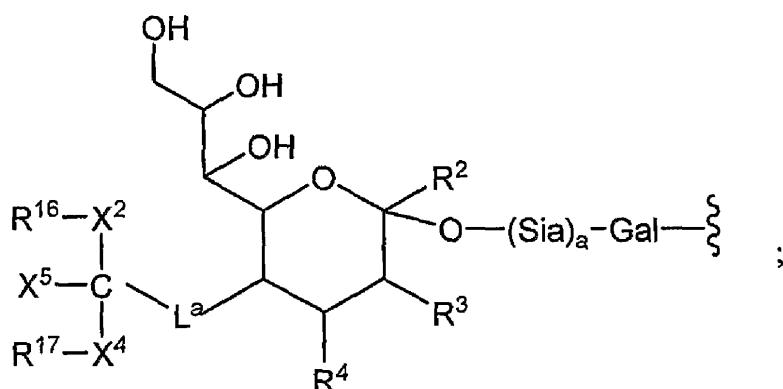


に基づく構造を有する。上記の図の各々において、e、f、f'、およびf''は独立して1～2500から選択される整数を表す。指数q、q'およびq''は独立して1～20から選択される整数を表す。

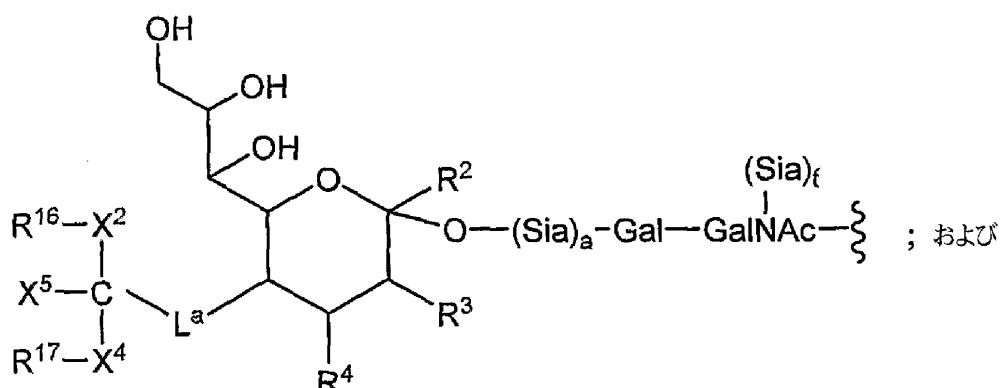
【0158】

別の代表的な実施形態において、G-C-S-Fペプチドは式

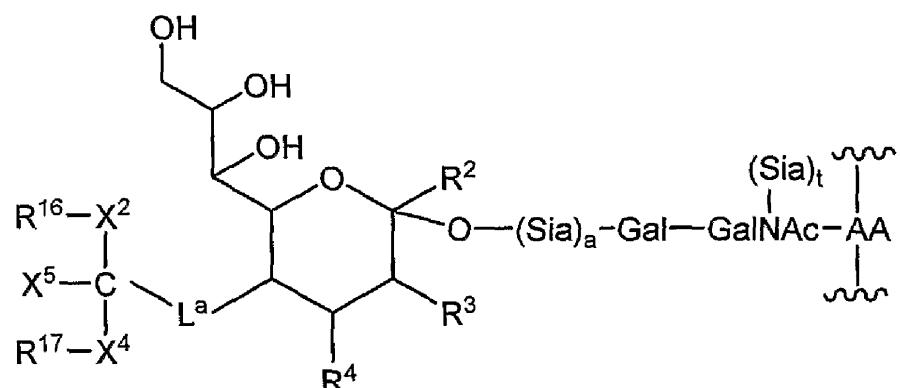
【化48】



10



20



30

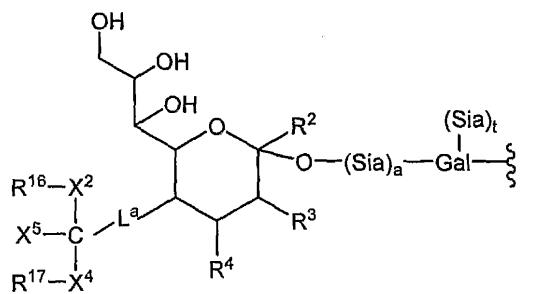
[式中、 L^a は、本明細書に記載された結合またはリンカーであり、指数 t は 0 または 1 を表し、指数 a は 0 または 1 を表す。これらの基の各々は、上記の一、二、三、および四触角のサッカリド構造の成分として包含されうる] から選択されるグリコシル部分を含んで成る。

【0159】

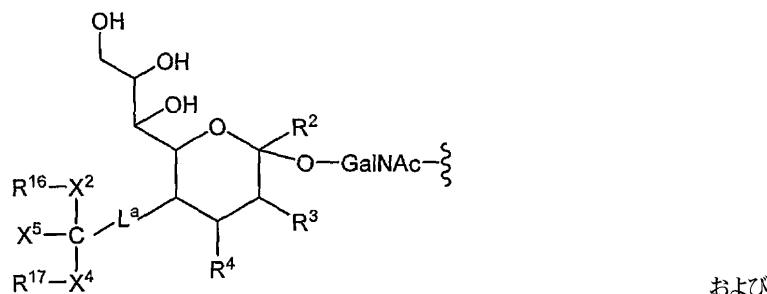
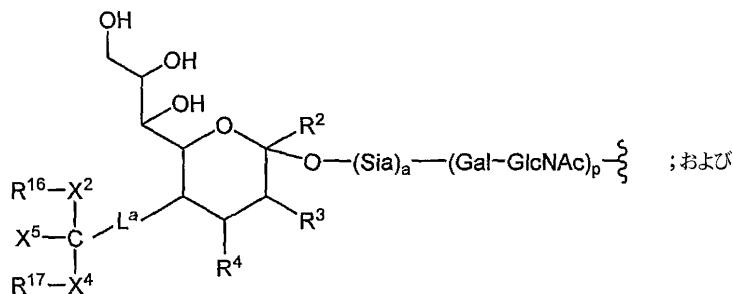
40

さらに別の実施形態において、本発明のコンジュゲートは、

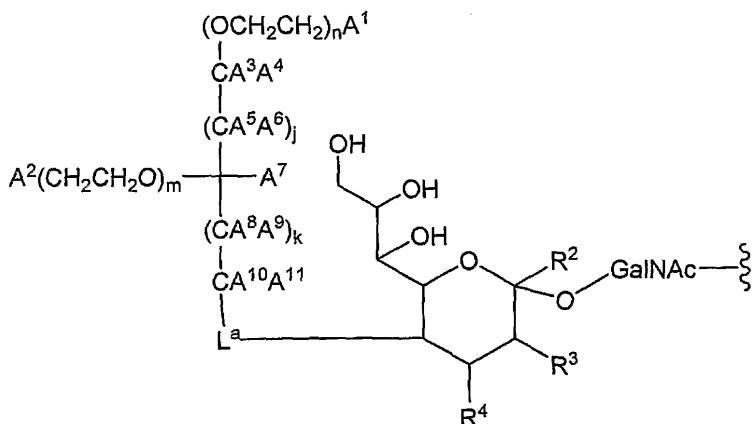
【化 4 9】



10



20



30

[式中、指数 a およびリンカー L^a は上記の通りである。指数 p は 1 ~ 10 の整数である。指数 t および a は独立して 0 または 1 から選択される。これらの基の各々は、上記の一、二、三、および四触角のサッカリド構造の成分として包含されうる] から選択される基礎構造を含む修飾グリコシリル残基を含む。

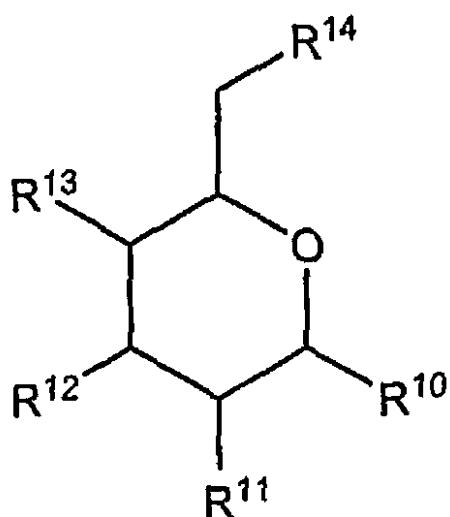
【0160】

さらに代表的な実施形態において、本発明は、上記のものなどのリンカー修飾基セツトを生み出す、対応するアミン部分に 6 - ヒドロキシリル位置が変換される修飾糖を使用する。これらの修飾糖のコアとして使用されうる代表的なサッカリール基としては、Gal、GalNAc、Galc、GalcNAc、Fuc、Xyl、Manなどが挙げられる。本実施形態による代表的な修飾糖は式

40

50

【化 5 0】



10

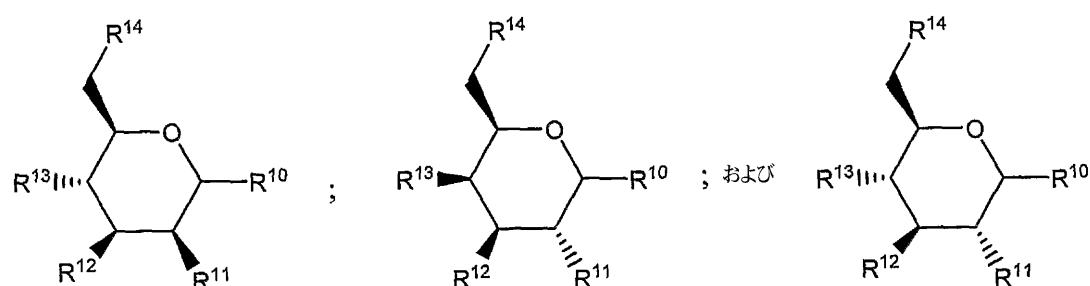
[式中、R^{1~4}は、H、OH、C(O)CH₃、NH、およびNHCOCH₃から独立して選択されるメンバーである。R¹⁰は、別のグリコシル残基(-O-グリコシル)またはG-CSFペプチドのアミノ酸(-NH-(G-CSF))とのリンクである。R¹⁴は、OR¹、NHR¹、またはNH-L-R¹である。R¹およびNH-L-R¹は上記の通りである]を有する。

20

【0161】

本モチーフによる選択コンジュゲートは、マンノース、ガラクトース、もしくはグルコース、またはマンノース、ガラクトース、もしくはグルコースの立体化学反応を有する種に基づく。これらのコンジュゲートの一般式は、

【化 5 1】



30

である。

【0162】

上記の通り、本発明は、修飾基、これらの種の活性化類似体、およびペプチドや脂質および本発明の修飾サッカリドなどの種間に形成されたコンジュゲートを有するサッカリドを提供する。

40

【0163】

修飾糖

本発明では修飾糖および修飾糖ヌクレオチドを使用し、修飾糖のコンジュゲートを形成する。本発明において使用される修飾糖化合物において、糖部分は、好ましくは、サッカリド、デオキシ-サッカリド、アミノ-サッカリド、またはN-アシルサッカリドである。「サッカリド」およびその等価物、「サッカリール」、「糖」、および「グリコシル」という語は、モノマー、二量体、オリゴマー、およびポリマーを指す。糖部分は修飾基で官能化もされる。修飾基は、一般的に、糖上のアミン、スルフヒドリル、またはヒドロキ

50

シル、例えば、一級ヒドロキシル、部分とのコンジュゲーションにより、糖部分にコンジュゲートされる。代表的な実施形態において、修飾基は、糖上のアミン部分により、例えば、修飾基の反応誘導体とのアミンの反応により形成されるアミド、ウレタン、または尿素により結合される。

【0164】

任意の糖を本発明のコンジュゲートのグリコシル連結基の糖コアとして使用されうる。本発明の組成物の形成において有用である代表的な糖コアとしては、グルコース、ガラクトース、マンノース、フコース、およびシアル酸が挙げられるが、これらに限定されない。他の有用な種としては、グルコサミン、ガラクトサミン、マンノサミン、シアル酸の5-アミン類似体などのアミノ糖が挙げられる。糖コアは自然に存在する構造でありうるとともに、修飾基をコンジュゲートするための部位を提供するように修飾されうる。例えば、1つの実施形態において、本発明は、9-ヒドロキシ部分がアミンで置換されるシアル酸誘導体を提供する。該アミンは、選択修飾基の活性化類似体で容易に誘導体化される。

10

【0165】

代表的な修飾糖は、水溶性または水不溶性ポリマーで修飾される。有用なポリマーの例はさらに以下で例示される。

【0166】

水溶性ポリマー

多くの水溶性ポリマーが当業者に周知であり、本発明の実施において有用である。水溶性ポリマーという語は、サッカリド（例えば、デキストラン、アミロース、ヒアルロン酸、ポリ（シアル酸）、ヘパラン、ヘパリン、等）、ポリ（アミノ酸）、例えば、ポリ（アスパラギン酸）、およびポリ（グルタミン酸）、核酸、合成ポリマー（例えば、ポリ（アクリル酸）、ポリ（エーテル）、例えば、ポリ（エチレングリコール）、ペプチド、タンパク質などの種を包含する。本発明は、ポリマーがコンジュゲートの残りの部分を結合することができる点を含む必要があるという唯一の制限とともに水溶性ポリマーで実施されうる。

20

【0167】

ポリマーの活性化の方法は、国際公開第94/17039号パンフレット、米国特許第5,324,844号明細書、国際公開第94/18247号パンフレット、国際公開第94/04193号パンフレット、米国特許第5,219,564号明細書、米国特許第5,122,614号明細書、国際公開第90/13540号パンフレット、米国特許第5,281,698号明細書、さらに国際公開第93/15189号パンフレット、および活性化ポリマーとペプチド、例えば、凝固因子VIIIとの間のコンジュゲーション（国際公開第94/15625号パンフレット）、ヘモグロビン（国際公開第94/09027号パンフレット）、酵素を有する分子（米国特許第4,412,989号明細書）、リボヌクレアーゼおよびスーパーオキシドジスムターゼ（ベロネーゼ（Veronese）ら、App. Biochem. Biotech. 11: 141-45頁（1985年））についても確認されうる。

30

【0168】

好ましい水溶性ポリマーは、ポリマーの試料中のポリマー分子の実質的な割合がほぼ同じ分子量であるものであり、かかるポリマーは「同種分散（homodisperse）」である。

40

【0169】

本発明はさらに、ポリ（エチレングリコール）コンジュゲートを参照することにより例示される。PEGの官能化およびコンジュゲーションに関するいくつかの検討およびモノグラフが入手可能である。例えば、ハリス（Harris）、Macronol. Chem. Phys. C25:325-373頁（1985年）、スクーテン（Scouten）、Methods in Enzymology 135:30-65頁（1987年）、ワン（Wong）ら、Enzyme Microb. Technol. 14:866-874頁（1992年）、デルガド（Delgado）ら、Critical Rev

50

iews in Therapeutic Drug Carrier Systems 9:249-304頁(1992年)、ザリップスキー(Zalipsky)、Bioc onjugate Chem. 6:150-165頁(1995年)、およびバドラー(Bhadra)ら、Pharmazie, 57:5-29頁(2002年)を参照。反応性PEG分子を調製し、反応分子を使用してコンジュゲートを形成するための経路は当業界で周知である。例えば、米国特許第5,672,662号明細書は、線状または分岐ポリ(アルキレンオキシド)、ポリ(オキシエチル化ポリオール)、ポリ(オレフィンアルコール)、およびポリ(アクリロモルホリン)から選択されるポリマー酸の活性エステルの水溶性および単離可能なコンジュゲートを開示している。

【0170】

10

米国特許第6,376,604号明細書は、有機溶媒中にジ(1-ベンゾトリアゾイル)炭酸塩とポリマーのヒドロキシルの末端を反応させることによって水溶性および非ペプチドポリマーの水溶性1-ベンゾトリアゾイル炭酸エステルを調製するための方法を記載している。活性エステルは、タンパク質またはペプチドなど生物活性剤とのコンジュゲートを形成するために使用される。

【0171】

国際公開第99/45964号パンフレットは、ポリマー骨格を含んで成り、安定したリンクエージによりポリマー骨格との少なくとも1つの末端連結を有する生物活性薬剤および活性化水溶性ポリマーを含んで成るコンジュゲートを記載しているが、ここで少なくとも1つの末端は分岐部分を含んで成り、この分岐部分に近位の反応基連結を有し、ここで生物活性薬剤は近位反応基の少なくとも1つに連結されている。他の分岐ポリ(エチレングリコール)が国際公開第96/21469号パンフレットに記載されており、米国特許第5,932,462号明細書は、反応官能基を含む分岐末端を含む分岐PEG分子で形成されたコンジュゲートを記載している。ポリ(エチレングリコール)と生物活性種との間でコンジュゲートを形成する、タンパク質またはペプチドなど生物活性種と反応させる遊離反応基が入手可能である。米国特許第5,446,090号明細書は、二官能性PEGリンクカーおよびPEGリンクカー末端の各々でペプチドを有するコンジュゲートの形成におけるその使用を記載している。

20

【0172】

30

分解性PEGリンクエージを含むコンジュゲートが国際公開第99/34833号パンフレット、および国際公開第99/14259号パンフレットのほか、米国特許第6,348,558号明細書に記載されている。かかる分解性リンクエージが本発明において利用可能である。

【0173】

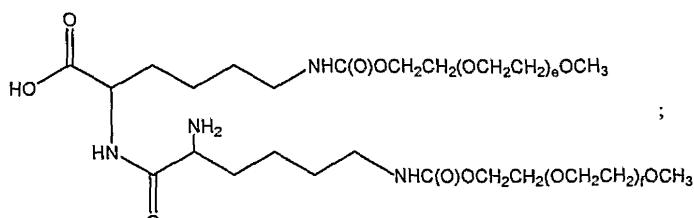
上記のポリマー活性化の当技術分野で承認されている方法は、本明細書に記載の分岐ポリマーの形成における本発明との関連で使用され、これらの分岐ポリマーを他の種、例えば、糖、糖ヌクレオチドなどとのコンジュゲートのためのものもある。

【0174】

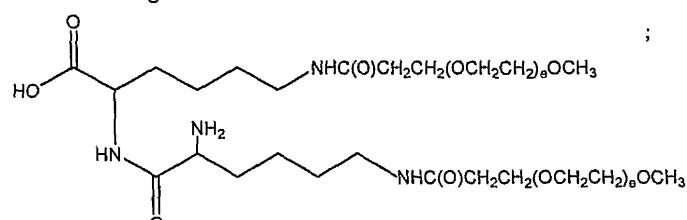
40

修飾糖は、グリコシルコア(またはコア上のリンクエー)をポリマー修飾部分(またはポリマー修飾部分上のリンクエー)と接触させることによって調製される。次の議論は、本発明において使用される選択ポリマー修飾部分の例を提供する。例えば、代表的なポリマー修飾部分は、アミノ酸、例えば、セリン、システイン、リシン、および小ペプチド、例えば、lys-lysを含有する側鎖に基づく。代表的な構造は以下を含む。

【化 5 2】

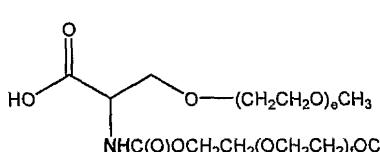
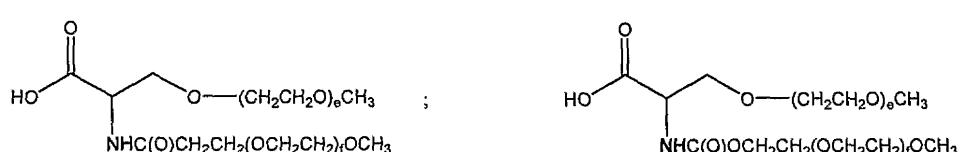
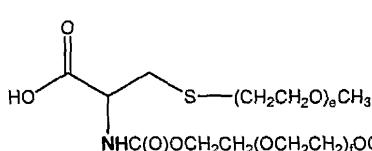
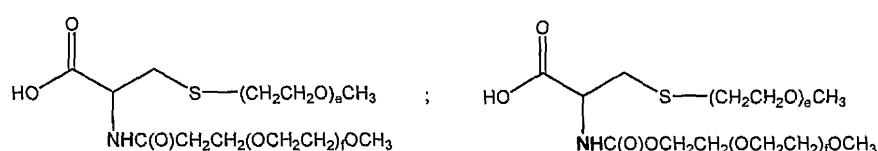


;

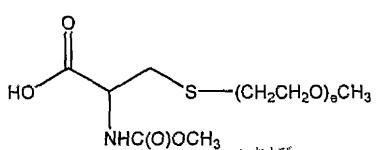
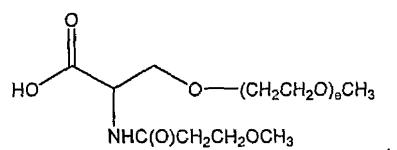


;

10



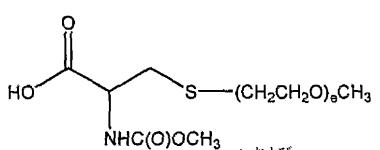
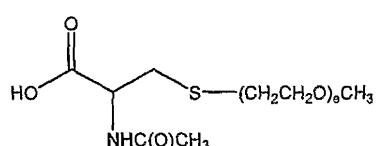
20



;

および

30



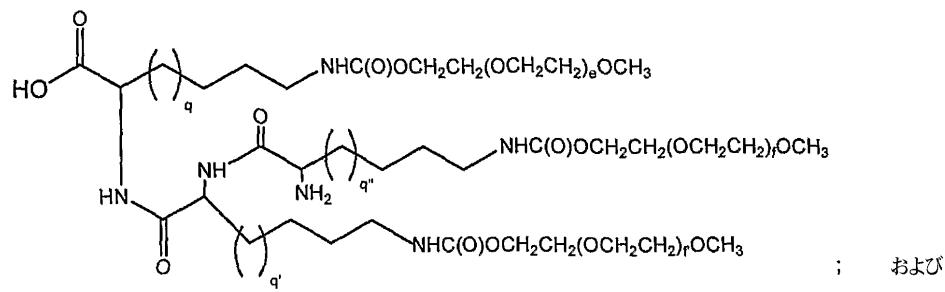
当業者は、ジ・リシン構造における遊離アミンがPEG部分とのamideまたはウレタンによりPEG化されうることも十分に理解するであろう。

【0175】

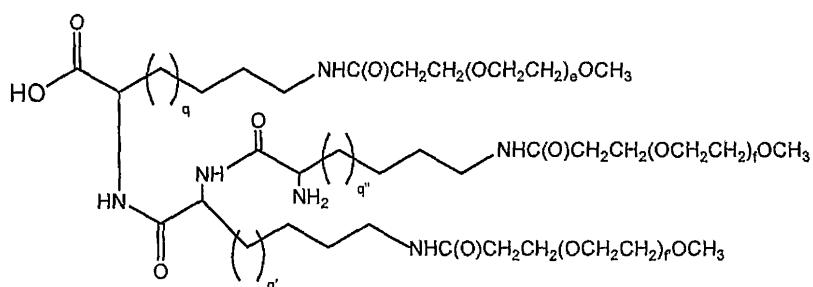
さらに別の実施形態において、分岐PEG部分は、トリ-リシンペプチドに基づく。トリ-リシンは、モノ、ジ-、トリ-、またはテトラ-PEG化されうる。本実施形態による代表的な種は式

40

【化 5 3】



； および



[式中、e、f、およびf'は、1～2500から独立して選択される整数であり、かつ
q、q'、およびq''は、1～20の独立して選択される整数である]を有する。

【0176】

当業者には明らかなように、本発明において使用される分岐ポリマーは、上記のテーマでの変化物を含む。例えば、上記のジ-リシン-PEGコンジュゲートは、3つのポリマーサブユニットを含みうるが、第3は上記の構造において未修飾でしめされている-アミンに結合されている。同様に、所望の方法でポリマー修飾部分で標識された3つもしくは4つのポリマーサブユニットで官能化されたトリ-リシンの使用は本発明の範囲内である。

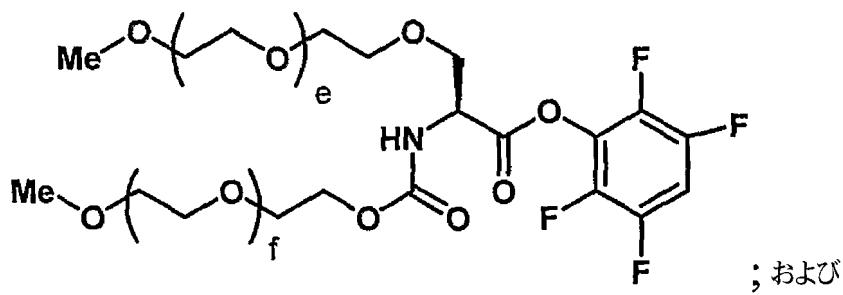
【0177】

ポリマー修飾部分は、グリコシルコアとの反応のために活性化されうる。活性化種（例えば、炭酸塩および活性エステル）の代表的な構造は、

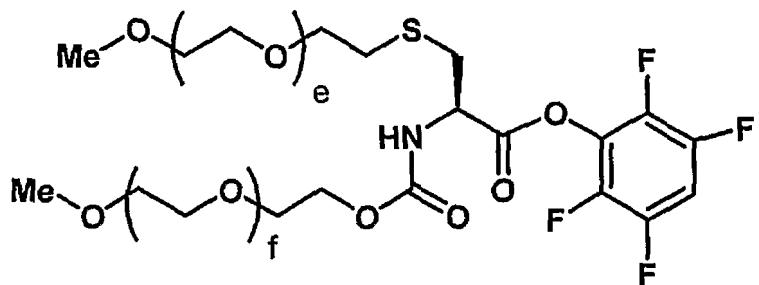
20

30

【化 5 4】



10



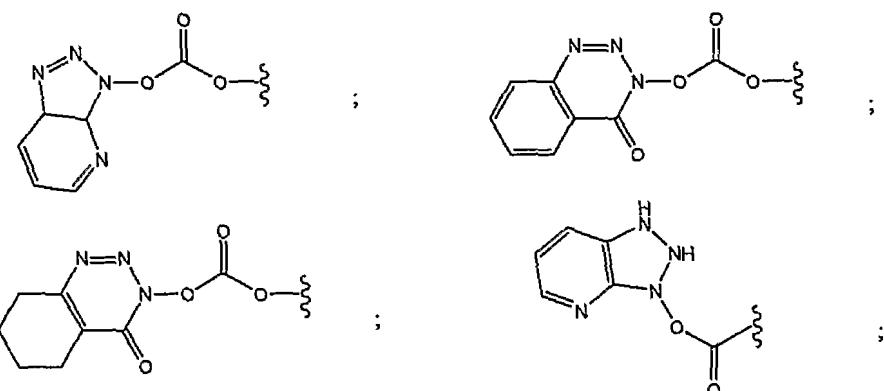
20

を含む。

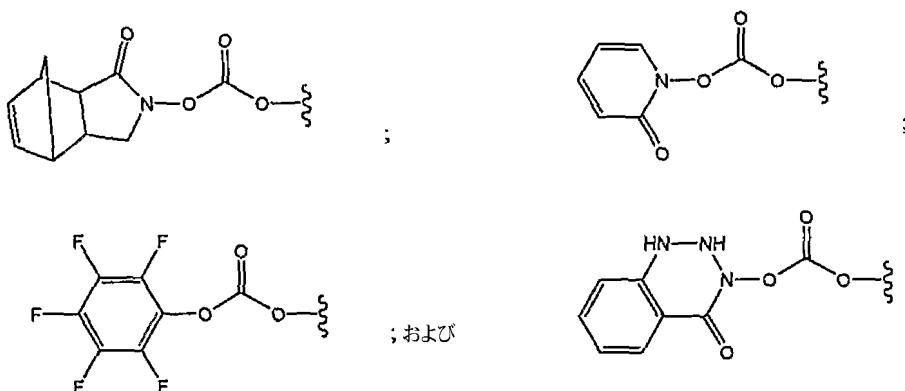
【0178】

本明細書に記載された化合物の調製において使用される線状および分岐PEGを活性化するために適切な他の活性化、または脱離基は、

【化 5 5】



30



40

を含むがこれに限定されない。

50

これらおよび他の種で活性化されるPEG分子および活性化PEGを製造する方法は、国際公開第04/083259号パンフレットに記載されている。

【0179】

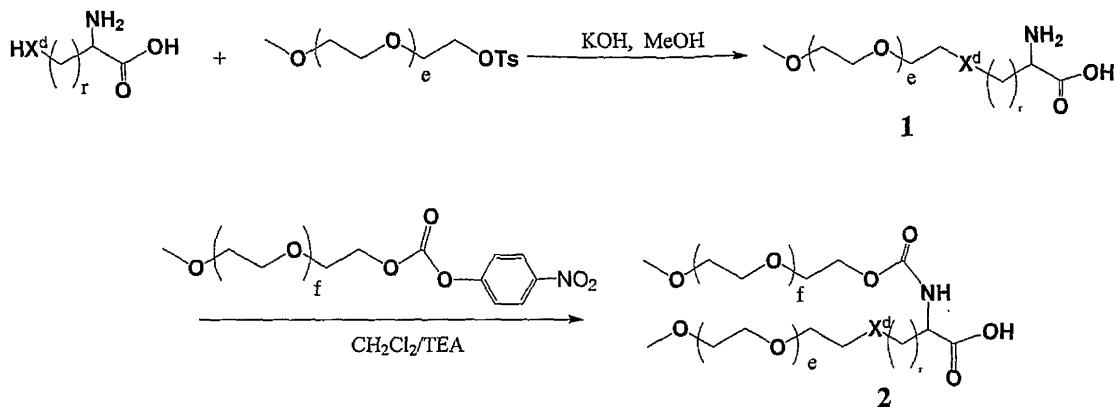
当業者は、上記の分岐ポリマーの1つもしくはそれ以上のm-PEG腕が、異なる末端、例えば、OH、COOH、NH₂、C₂-C₁₀-アルキル等を有するPEG部分によって置換されることを十分に理解するであろう。さらに、上記の構造は、アミノ酸側鎖の-炭素原子と官能基との間にアルキルリンカーを挿入すること（または炭素原子を除去すること）によって容易に修飾される。したがって、「ホモ」誘導体および高いホモログ、および低いホモログが本発明において使用される分岐PEGのためのコアの範囲内である。

10

【0180】

本明細書に記載された分岐PEG種は、以下のスキーム

【化56】



[式中、X^dはOまたはSであり、rは1～5の整数である。指数eおよびfは独立して選択される1～2500の整数である。代表的な実施形態において、これらの指数の一方または両方は、ポリマーが分子量において約10kD、15kD、または20kDであるように選択される]に記載されているものなどの方法によって容易に調製される。

30

【0181】

したがって、本スキームによれば、天然または非天然アミノ酸が、活性化m-PEG誘導体、この場合には、トシレートと接触し、側鎖ヘテロ原子X^dをアルキル化することによって1を形成する。単機能化m-PEGアミノ酸は、反応性m-PEG誘導体によるN-アシル化条件を受け、それによって、分岐m-PEG2をアセンブルする。当業者が十分に理解するように、トレシレート脱離基は、適切な脱離基、例えば、ハロゲン、メシレート、トリフレート等で置換される。同様に、アミンをアシル化するために使用される反応炭酸塩は、活性エステル、例えば、N-ヒドロキシスクシンイミド等によって置換され、または酸は、ジシクロヘキシルカルボジイミド、カルボニルジイミダゾール等など脱水剤を使用してインサイチューで活性化される。

40

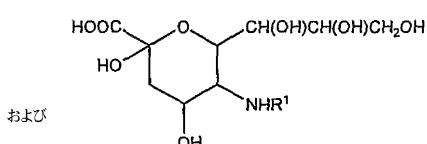
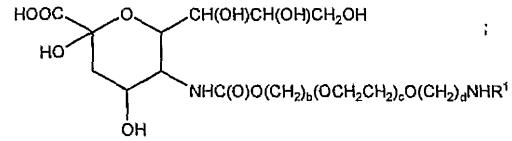
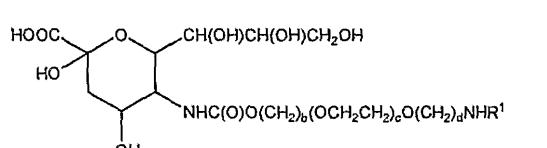
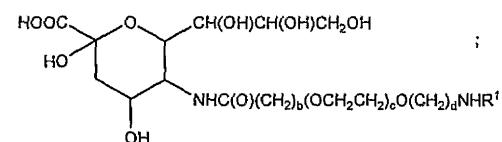
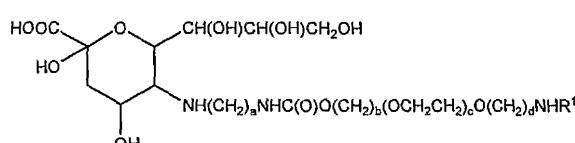
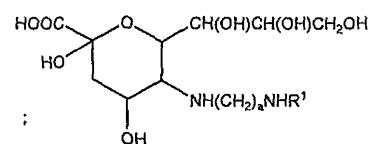
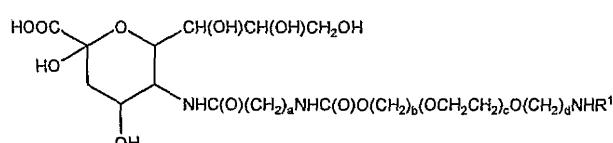
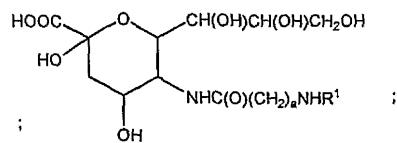
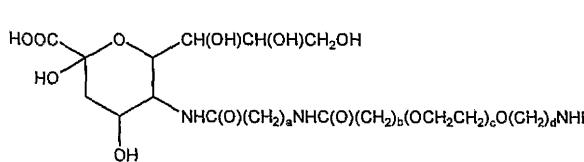
【0182】

他の代表的な実施形態において、尿素部分はアミドなどの基によって置換される。

【0183】

例示的実施形態において、修飾糖はシアル酸であり、本発明において使用される選択修飾糖化合物は次式を有する。

【化 5 7】



および

指標 a、b、および d は 0 ~ 20 の整数である。指標 c は 1 ~ 2500 の整数である。上記の構造物は R^{1~5} の成分でありうる。

【0184】

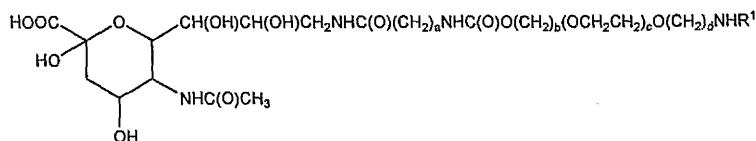
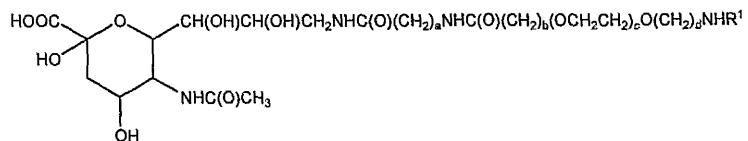
別の例示的実施形態において、糖の 1 級ヒドロキシル部分が修飾基で官能化される。例えば、シアル酸の 9 - ヒドロキシルは対応するアミンに変換され、官能化され、本発明による化合物を提供しうる。本実施形態による式は以下を含む。

10

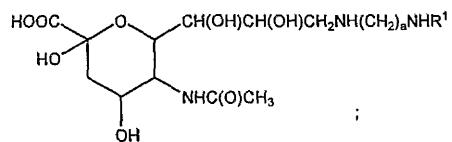
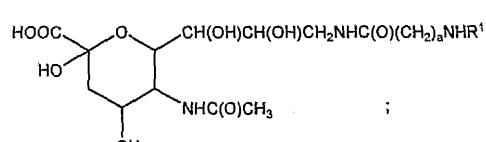
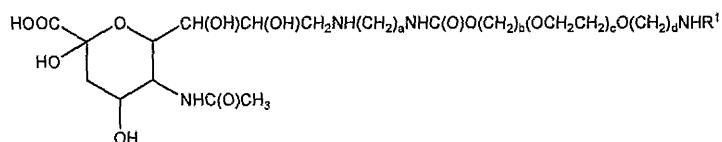
20

30

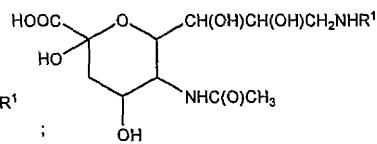
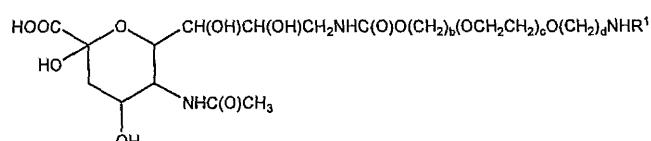
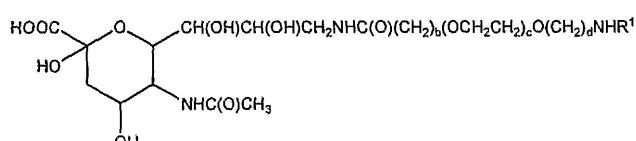
【化 5 8】



10



20



上記の構造物は R^{1-5} の成分でありうる。

〔 0 1 8 5 〕

30

当業者が十分に理解するように、上記の代表的な化合物におけるシアル酸部分は、グルコサミン、ガラクトサミン、マンノサミン、そのN-アシル誘導体などを含むが、これらに限定されない他のいづれかのアミノ-サッカリドで置換されうる。

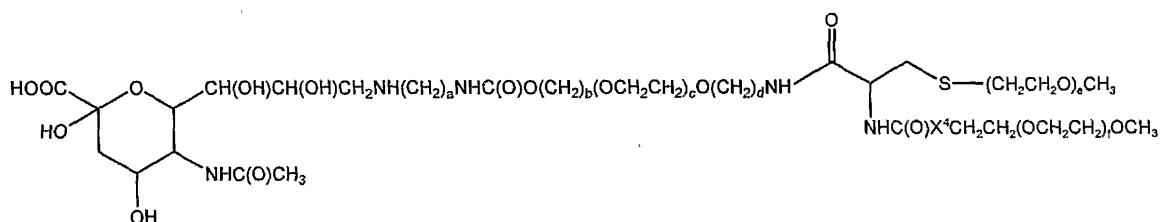
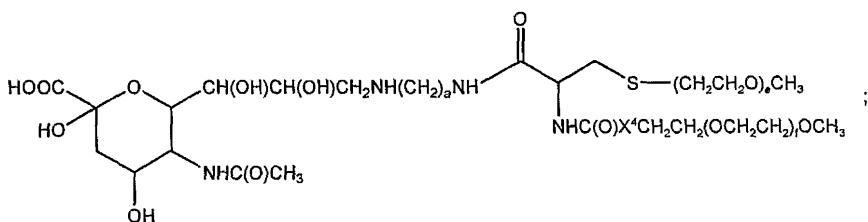
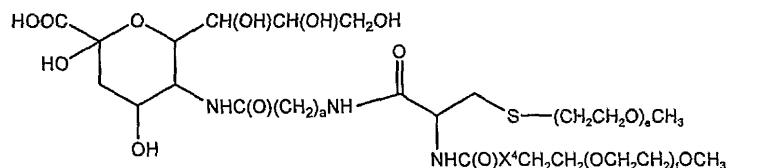
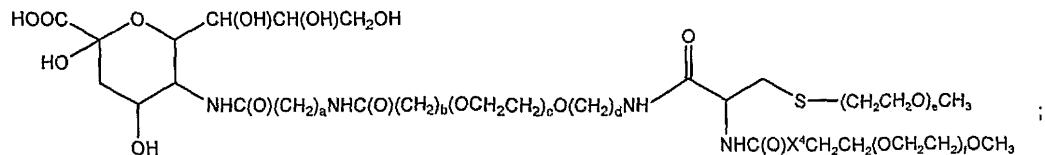
[0 1 8 6]

本発明は、PEGを参照することにより前項で例示されているが、当業者が十分に理解するように、一連のポリマー修飾部分が本発明による化合物および方法に使用される。

〔 0 1 8 7 〕

選択実施形態において、R¹ または L - R¹ は分岐PEG、例えば、上記の種の1つである。本実施形態による例示的修飾糖は

【化 5 9】

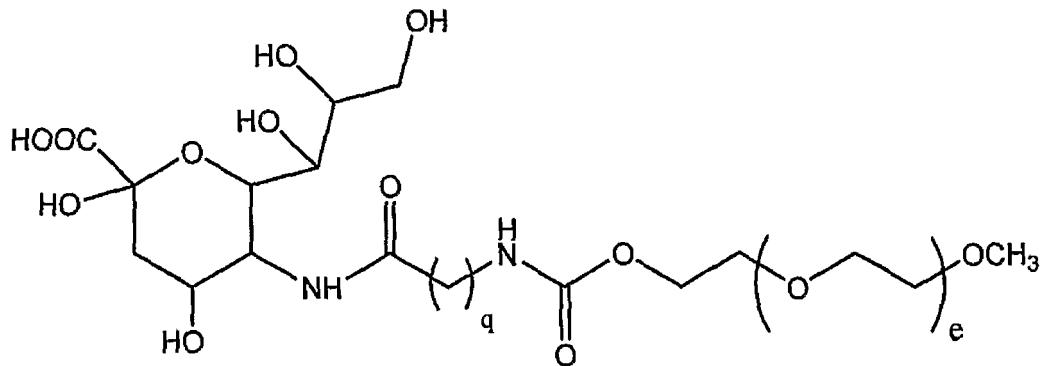


[式中、 X^4 は、結合または O である] を含む。上記の構造の各々において、アルキルアミンリンカー - $(CH_2)_a NH -$ は存在または非存在でありうる。上記の構造物は R^1
 $^5 / R^1$
 5 の成分でありうる。

【 0 1 8 8 】

本明細書で論じるように、本発明における脂溶のポリマー修飾シアル酸は線状構造でもありうる。したがって、本発明は、

【化 6 0 】



[式中、q および e は上記の通りである]などの構造物由来のシアル酸部分を含むコンジュゲートを提供する。

〔 0 1 8 9 〕

水不溶性ポリマー

上記のものと類似の別の実施形態において、修飾糖は、水溶性ポリマーではなく、水不溶性ポリマーを含む。本発明のコンジュゲートは、1つもしくはそれ以上の水不溶性ポリマーも含みうる。本発明の本実施形態は、それにより制御された方法で治療的ペプチドを送達するビヒクルとしてのコンジュゲートの使用によって説明される。ポリマー薬物送達系は当業界で周知である。例えば、ダン (Dunn) ら編、POLYMERIC DRUGS AND DELIVERY SYSTEMS, ACS Symposium Series 第469巻、米国化学会、Washington, D.C. 1991年。当業者は、実質的にすべての既知の薬物送達系が本発明のコンジュゲートに利用可能であることを十分に理解するであろう。

【0190】

10

R^1 、 $L - R^1$ 、 $R^{1.5}$ 、 $R^{1.5'}$ 、および他のラジカルの上記のモチーフは同等に水不溶性ポリマーに適用可能であり、これは当業者に容易に利用可能な化学反応を使用して制限なしに線状および分岐構造へ組込まれうる。

【0191】

代表的な水不溶性ポリマーとしては、ポリホスファジン、ポリ(ビニルアルコール)、ポリアミド、ポリ炭酸塩、ポリアルキレン、ポリアクリルアミド、ポリアルキレングリコール、ポリアルキレンオキシド、ポリアルキレンテレフタレート、ポリビニルエーテル、ポリビニルエステル、ポリビニルハロゲン化物、ポリビニルピロリドン、ポリグリコリド、ポリシロキサン、ポリウレタン、ポリ(メチルメタクリレート)、ポリ(エチルメタクリレート)、ポリ(ブチルメタクリレート)、ポリ(イソブチルメタクリレート)、ポリ(ヘキシルメタクリレート)、ポリ(イソデシルメタクリレート)、ポリ(ラウリルメタクリレート)、ポリ(フェニルメタクリレート)、ポリ(メチルアクリレート)、ポリ(イソプロピルアクリレート)、ポリ(イソブチルアクリレート)、ポリ(オクタデシルアクリレート)ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ(エチレングリコール)、ポリ(エチレンオキシド)、ポリ(エチレンテレフタレート)、ポリ(ビニルアセテート)、ポリビニルクロライド、ポリスチレン、ポリビニルピロリドン、ブルロニック、およびポリビニルフェノール、およびそのコポリマーが挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0192】

本発明のコンジュゲートにおいて使用される合成修飾天然ポリマーとしては、アルキルセルロース、ヒドロキシアルキルセルロース、セルロースエーテル、セルロースエステル、およびニトロセルロースが挙げられるが、これらに限定されない。広範のクラスの合成修飾天然ポリマーの特に好ましいメンバーとしては、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシブチルメチルセルロース、セルロースアセテート、セルロースプロピオネート、セルロースアセテートブチレート、セルロースアセテートフタレート、カルボキシメチルセルロース、セルローストリニアセテート、硫酸セルロースナトリウム塩、およびアクリルおよびメタクリルエステルのポリマー、およびアルギン酸が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0193】

本明細書で論じられたこれらおよび他のポリマーは、シグマ・ケミカル社 (Sigma Chemical Co.) (St. Louis、ミズーリ州 (MO))、ポリサイエンス (Polysciences) (Warrenton、ペンシルベニア州 (PA))、アルドリッヂ (Aldrich) (Milwaukee、ウィスコンシン州 (WI))、フルカ (Fluka) (Ronkonkoma、ニューヨーク州 (NY))、およびバイオラッド (BioRad) (Richmond、カリフォルニア州 (CA))などの商業的供給源から容易に得られ、あるいは標準方法を使用してこれら供給元から得られるモノマーから合成されうる。

40

【0194】

本発明のコンジュゲートにおいて使用される代表的な生体分解性ポリマーとしては、ポリラクチド、ポリグリコリド、およびそのコポリマー、ポリ(エチレンテレフタレート

50

）、ポリ（酪酸）、ポリ（吉草酸）、ポリ（ラクチド-*co*-カプロラクトン）、ポリ（ラクチド-*co*-グリコリド）、ポリ無水物、ポリオルトエステル、その混合物およびコポリマーが挙げられるが、これらに限定されない。特に使用されるのは、コラーゲン、フルロニックなどを含むものなどゲルを形成する組成物である。

【0195】

本発明において使用されるポリマーとしては、少なくともその構造の一部分内に生体吸収性分子を有する水溶性材料を含む「ハイブリッド」ポリマーが挙げられる。かかるポリマーの例が、ポリマー鎖当たり生体吸収性部位、親水性部位、および複数の架橋可能官能基を有する水不溶性コポリマーを含むものである。

【0196】

本発明において、「水不溶性材料」は、水または水含有環境下に実質的に不溶性である材料を含む。したがって、コポリマーの一定の部位または部分は親水性またはさらに水溶性でありうるが、ポリマー分子は、全体として、水中で実質的程度に溶解することはない。

【0197】

本発明において、「生体吸収性分子」という語は、体によって正常な排泄経路により代謝され、または分解され、および吸収され、かつ/または除去されうる部位を含む。かかる代謝産物または分解生成物は、好ましくは、実質的に体に対して非毒性である。

【0198】

生体吸収性部位は、コポリマー組成物が全体として水溶性が提供されない限り、疎水性または親水性でありうる。したがって、生体吸収性部位は、ポリマーが、全体として、水不溶性のままである選好に基づき選択される。したがって、相対的特性、すなわち、含まれる官能基の種類、および生体吸収性部位の相対的特性、および親水性部位は、有用な生体吸収性組成物が水不溶性のままであること確実にするために選択される。

【0199】

代表的な吸収性ポリマーとしては、例えば、ポリ（-ヒドロキシ-カルボン酸）/ポリ（オキシアルキレン、（コーン（Cohn）ら、米国特許第4,826,945号明細書）の合成製造された吸収性ブロックコポリマーが挙げられる。これらのコポリマーは架橋されず、水溶性であるため、体は分解ブロックコポリマー組成物を排泄することができる。ユーニス（Younes）ら、J. Biomed. Mater. Res. 21: 1301-1316頁（1987年）、およびコーン（Cohn）ら、J. Biomed. Mater. Res. 22: 993-1009頁（1988年）を参照。

【0200】

現在、好ましい生体吸収性ポリマーとしては、ポリ（エステル）、ポリ（ヒドロキシ酸）、ポリ（ラクトン）、ポリ（アミド）、ポリ（エステル-アミド）、ポリ（アミノ酸）、ポリ（無水物）、ポリ（オルトエステル）、ポリ（炭酸塩）、ポリ（ホスファジン）、ポリ（ホスホエステル）、ポリ（チオエステル）、ポリサッカリド、およびその混合物から選択される1つもしくはそれ以上の成分が挙げられる。さらにより好ましくは、生体吸収性ポリマーとしては、ポリ（ヒドロキシ）酸成分が挙げられる。ポリ（ヒドロキシ）酸のうち、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリカプロ酸、ポリ酪酸、ポリ吉草酸、およびコポリマー、およびその混合物が好ましい。

【0201】

インビボ吸収される（「生体吸収性」）断片の形成に加えて、本発明の方法において使用されるための好ましいポリマーコーティングが排泄可能および/または代謝可能な断片も形成しうる。

【0202】

高次コポリマーも本発明において使用されうる。例えば、1984年3月20日に発行されたケーシー（Casey）ら、米国特許第4,438,253号明細書は、ポリ（グリコール酸）およびヒドロキシル末端ポリ（アルキレングリコール）のエステル交換から製造されたトリブロックコポリマーを開示している。かかる組成物は、吸収性モノフィラ

10

20

30

40

50

メント縫合糸として使用するために開示されている。かかる組成物の柔軟性は、テトラ-
p-トリルオルト炭酸塩など芳香族炭酸塩のコポリマー構造物への組込みによって制御さ
れる。

【0203】

乳酸および/またはグリコール酸に基づく他のポリマーも使用されうる。例えば、19
93年4月13日に発行された、スピヌ(Spinu)、米国特許第5,202,413号明細書は、オリゴマージオールまたはジアミン残基のいずれかへのラクチドおよび/またはグリコリドの開環重合の後、ジイソシアネート、ジアシルクロライド、またはジクロ
ロシランなど二官能性化合物による鎖延長によってポリラクチドおよび/またはポリグリ
コリドの連続的に順序化されたブロックを有する生分解性マルチブロックコポリマーを
開示している。
10

【0204】

本発明において有用なコーティングの生分解性部位は、加水分解的および/または酵
素的に開裂可能であるようにデザインされうる。本発明において、「加水分解的に開裂可
能」は、コポリマー、特に生分解性部位が、水および水含有環境下に加水分解の影響を
受けやすいことを指す。同様に、本明細書で使用される「酵素的に開裂可能」は、コポリ
マー、特に生分解性部位が、内因性または外因性酵素による開裂の影響を受けやすいこ
とを指す。

【0205】

体内に配置されると、親水性部位は排泄可能および/または代謝可能な断片へ加工され
うる。したがって、親水性部位は、例えば、ポリエーテル、ポリアルキレンオキシド、ポ
リオール、ポリ(ビニルピロリジン)、ポリ(ビニルアルコール)、ポリ(アルキルオキ
サゾリン)、ポリサッカリド、炭水化物、ペプチド、タンパク質、およびコポリマー、お
およびその混合物を含みうる。さらに、親水性部位は、例えば、ポリ(アルキレン)オキ
シドでありうる。かかるポリ(アルキレン)オキシドは、例えば、ポリ(エチレン)オキ
シド、ポリ(プロピレン)オキシド、およびその混合物、およびコポリマーを含みうる
。

【0206】

ヒドロゲルの成分であるポリマーも本発明において有用である。ヒドロゲルは、比較的
大量の水を吸収しうるポリマー材料である。化合物を形成するヒドロゲルの例としては、
ポリアクリル酸、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、ポリビニルアルコール、ポリ
ビニルピロリジン、ゼラチン、カラギナン、および他のポリサッカリド、ヒドロキシエチ
レンメタクリル酸(HEMA)のほか、その誘導体などが挙げられるが、これらに限定さ
れない。安定し、生分解性、かつ生分解性であるヒドロゲルが製造されうる。さら
に、ヒドロゲル組成物は、これらの特性の1つもしくはそれ以上を示すサブユニットを含
みうる。

【0207】

その完全性が架橋結合により制御されうる生分解性ヒドロゲル組成物が周知であり、
本発明の方法において使用するために現在、好ましい。例えば、1995年4月25日
発行のハッペル(Hubbel)ら、米国特許第5,410,016号明細書、および
1996年6月25日発行の同第5,529,914号明細書は、2つの加水分解的に不
安定な伸長間に挟まれた水溶性の中心ブロック部分を有する架橋結合ブロックコポリマー
である水溶性系を開示している。かかるコポリマーはさらに、光重合性アクリレート官能
性で末端キャップされる。架橋結合されると、これらの系はヒドロゲルになる。かかるコ
ポリマーの水溶性中心ブロックはポリ(エチレングリコール)を含みうるが、加水分解的に不
安定な伸長は、ポリグリコール酸またはポリ乳酸などのポリ(-ヒドロキシ酸)で
ありうる。ソーニー(Sawhney)ら、Macromolecules 26:58
1-587頁(1993年)を参照。

【0208】

別の好ましい実施形態において、ゲルは熱可逆性ゲルである。プルロニック、コラーゲ
20

10

20

30

40

50

ン、ゼラチン、ヒアルロン酸、ポリサッカリド、ポリウレタンヒドロゲル、ポリウレタン-尿素ヒドロゲル、およびそれらの組合せなどの成分を含む熱可逆性ゲルが現在、好ましい。

【0209】

さらに別の代表的な実施形態において、本発明のコンジュゲートは、リポソームの成分を含む。リポソームは、例えば、エプシュタイン（E p p s t e i n）ら、米国特許第4,522,811号明細書に記載されているような当業者に周知の方法に従って調製される。例えば、リポソーム製剤は、適切な脂質（ステアロイルホスファチジルエタノールアミン、ステアロイルホスファチジルコリン、アラカドイルホスファチジルコリン、およびコレステロールなど）を次いで蒸発される無機溶媒中に溶解し、容器の表面上の乾燥脂質の薄膜の背後に脱離することによって調製される。次いで、活性化合物またはその医薬的に許容される塩の水溶液を容器に導入する。次いで、容器を手で回転させ、容器の側面から脂質材料を取除き、脂質凝集体を分散させ、それによってリポソーム懸濁液を形成する。

【0210】

上記の微小粒子および微小粒子を調製する方法は実施例によって示され、それらは本発明において使用される微小粒子の範囲を規定することが意図されていない。異なる方法によって加工された一連の微小粒子が、本発明において使用されることは当業者には明らかであろう。

【0211】

水溶性ポリマーに関連した上記の構造的フォーマット、直鎖および分岐は一般に水不溶性ポリマーに対しても同じく適用可能である。したがって、例えば、システイン、セリン、ジリシン、およびトリリシン分岐コアは、2つの水不溶性ポリマー部分で官能化される。これらの種を製造するために使用される方法は一般に、水溶性ポリマーを製造するために使用されるものときわめて類似している。

【0212】

方法

上記のコンジュゲートに加えて、本発明は、これらおよび他のコンジュゲートを調製するための方法を提供する。さらに、本発明は、疾患を発症するリスクがある対象、または疾患を有する対象に本発明のコンジュゲートを投与することによって疾患状態を予防、治癒、または改善する方法を提供する。

【0213】

代表的な実施形態において、コンジュゲートは、ポリマー修飾部分とグリコシル化または未グリコシル化ペプチドとの間で形成される。ポリマーは、ペプチド（グリコシル残基）と修飾基（例えば、水溶性ポリマー）との間に挿入され、かつこれらに共有結合したグリコシル連結基によってペプチドにコンジュゲートされる。この方法は修飾糖および酵素、例えば、修飾糖を基質にコンジュゲートするグリコシルトランスフェラーゼを含有する混合物と接触させるステップを含む。反応は、修飾糖とペプチドとの間に共有結合を形成するのに適切な条件下に行われる。修飾糖の糖部分は、好ましくは、ヌクレオチド糖から選択される。

【0214】

代表的な実施形態において、上記のものなどの修飾糖は、対応するヌクレオチド糖として活性化される。その修飾形態で本発明において使用される代表的な糖ヌクレオチドは、ヌクレオチドー、二、および三リン酸、またはそれらの類似体を含む。好ましい実施形態において、修飾糖ヌクレオチドは、UDP-グリコシド、CMP-グリコシド、またはGDP-グリコシドから選択される。さらにより好ましくは、修飾糖ヌクレオチドの糖ヌクレオチド部分は、UDP-ガラクトース、UDP-ガラクトサミン、UDP-グルコース、UDP-グルコサミン、GDP-マンノース、GDP-フコース、CMP-シアル酸、またはCMP-NeuAcから選択される。代表的な実施形態において、リン酸ヌクレオチドはC-1に結合されている。

10

20

30

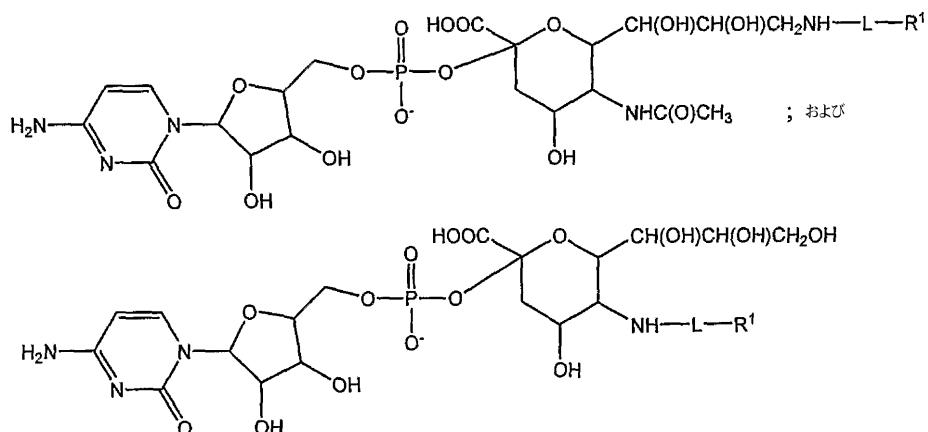
40

50

【0215】

したがって、グリコシル部分がシアル酸である例示的実施形態において、本発明の方法は式

【化61】



10

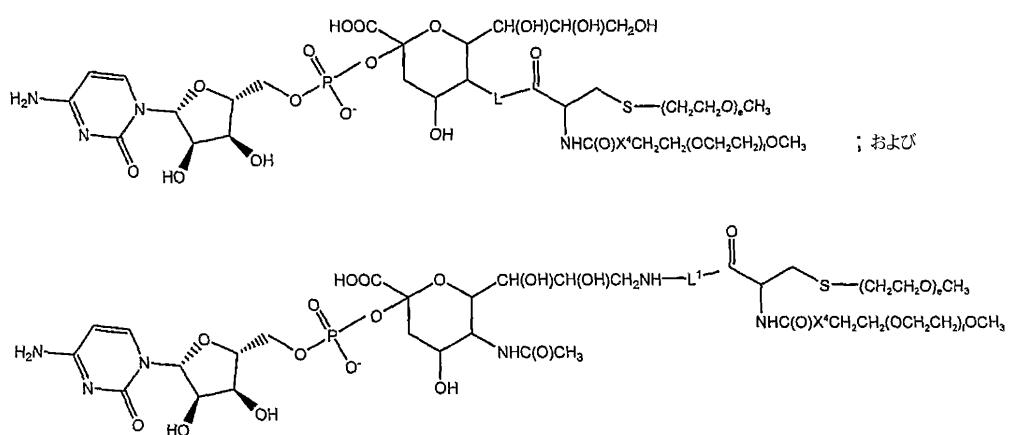
[式中、 $L - R^1$ は上記の通りであり、 $L^1 - R^1$ は修飾基に結合されたリンカーを表す。 L のように、 L^1 による代表的なリンカー種は、結合、アルキル、またはヘテロアルキル部分を含む] を有する化合物を使用する。

20

【0216】

さらに、上記の通り、本発明は、直鎖または分岐のいずれかである水溶性ポリマーで修飾されるヌクレオチド糖の使用を提供する。例えば、下記の式

【化62】



30

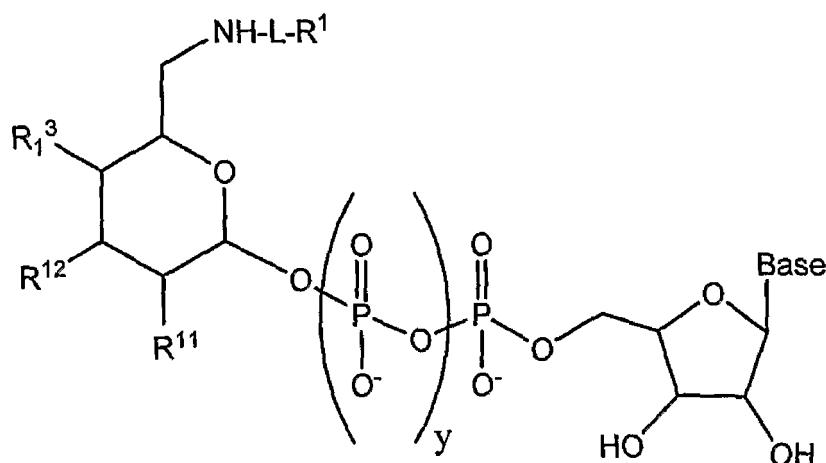
[式中、 X^4 はOまたは結合である] を有する化合物は本発明の範囲内のコンジュゲートを調製するために使用される。

40

【0217】

本発明は、6-炭素位置で $L - R^1$ で修飾された糖ヌクレオチドの使用をも提供する。本実施形態による代表的な種は、

【化 6 3】



10

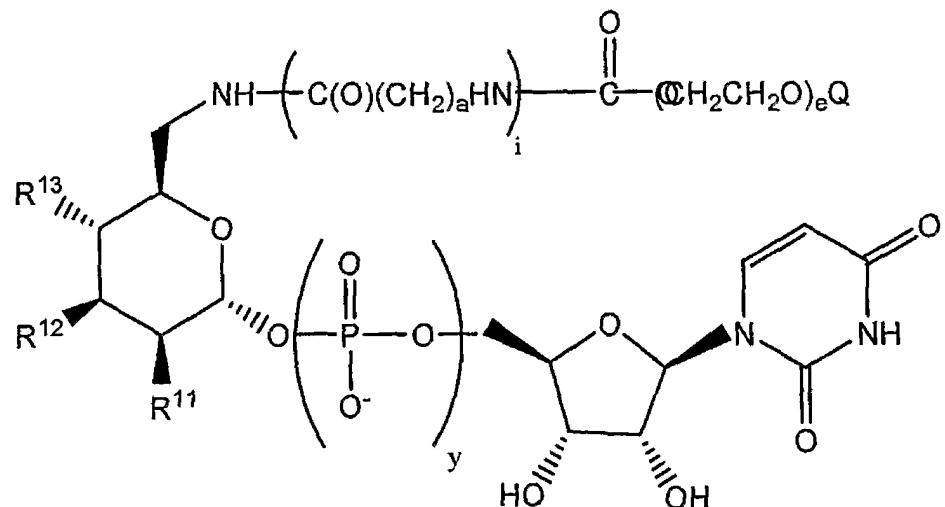
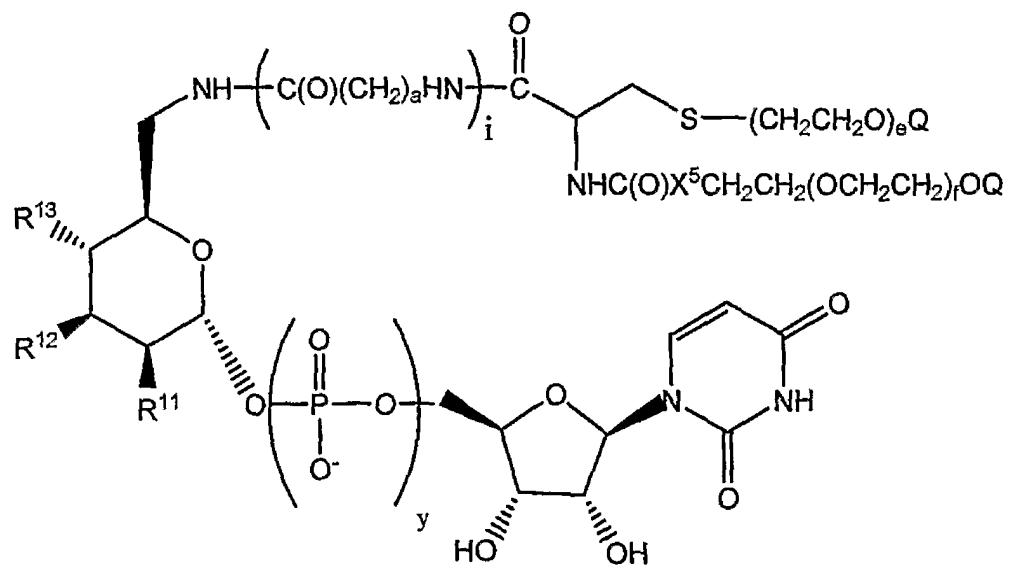
[式中、R基、およびLは、上記の部分を表す。指数「y」は0、1、または2である]を含む。代表的な実施形態において、LはNHとR¹との間の結合である。塩基は核酸塩基である。

【0218】

20

6-位置での炭素が修飾される本発明において使用される代表的なヌクレオチド種は、GDPマンノースの立体化学反応、例えば、

【化 6 4】



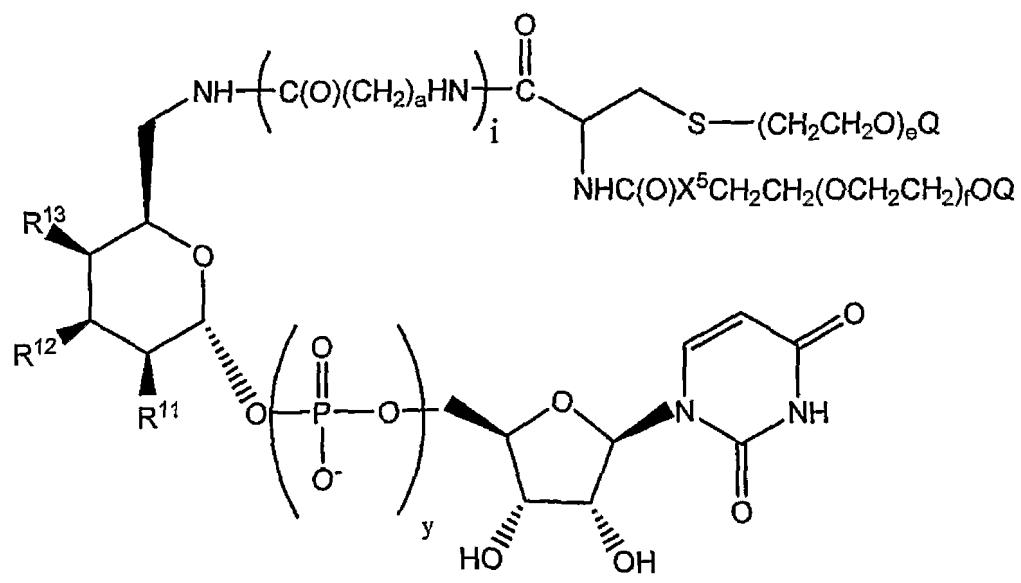
[式中、 X^5 は結合またはOである。指数iは0または1を表す。指数aは1～20の整数である。指数eおよびfは独立して1～2500の整数を表す。Qは、上記の通り、Hまたは置換もしくは非置換C₁～C₆アルキルである]を有する種を含む。当業者は十分に理解するように、SがOで置換されているセリン誘導体もこの一般モチーフの範囲内にある。

【0219】

さらに代表的な実施形態において、本発明は、修飾糖がUDPガラクトースの立体化学反応に基づくコンジュゲートを提供する。本発明において使用される代表的なヌクレオチド糖は構造

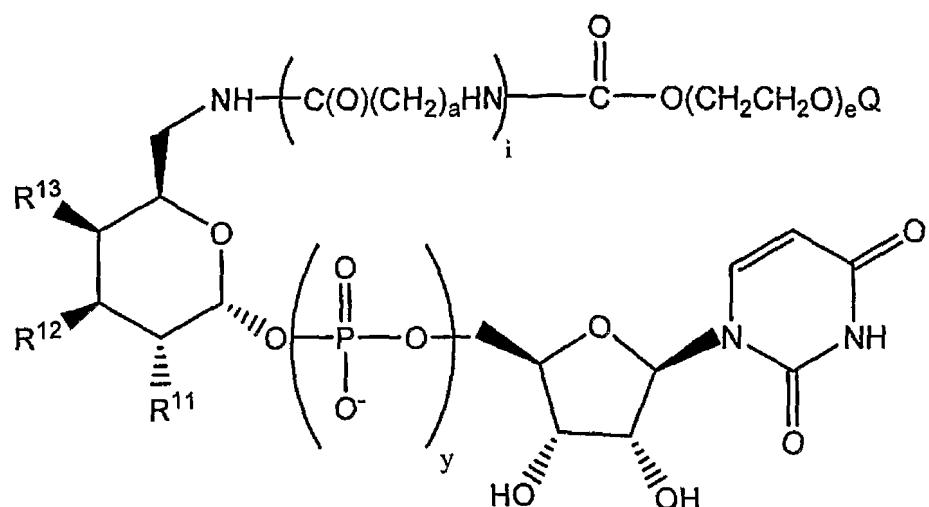
40

【化 6 5】



10

; および



20

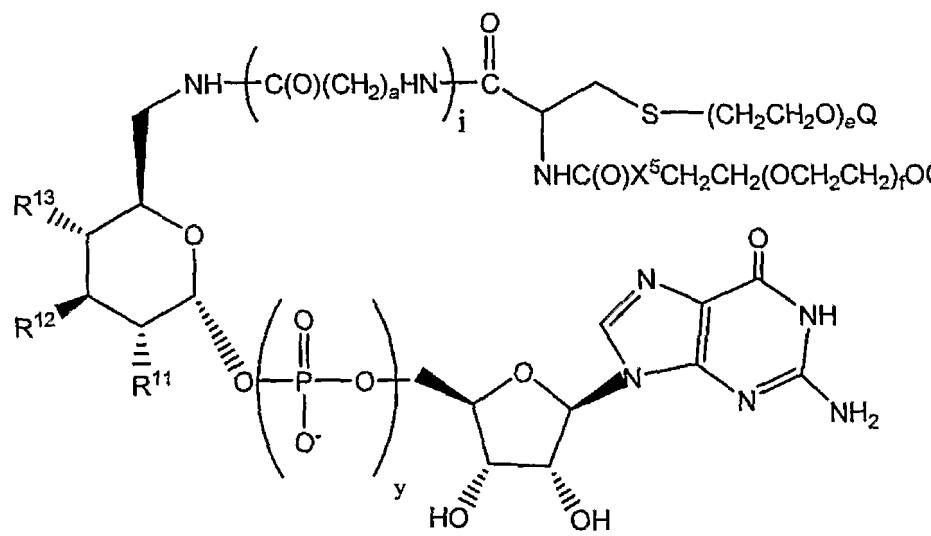
30

を有する。

【 0 2 2 0 】

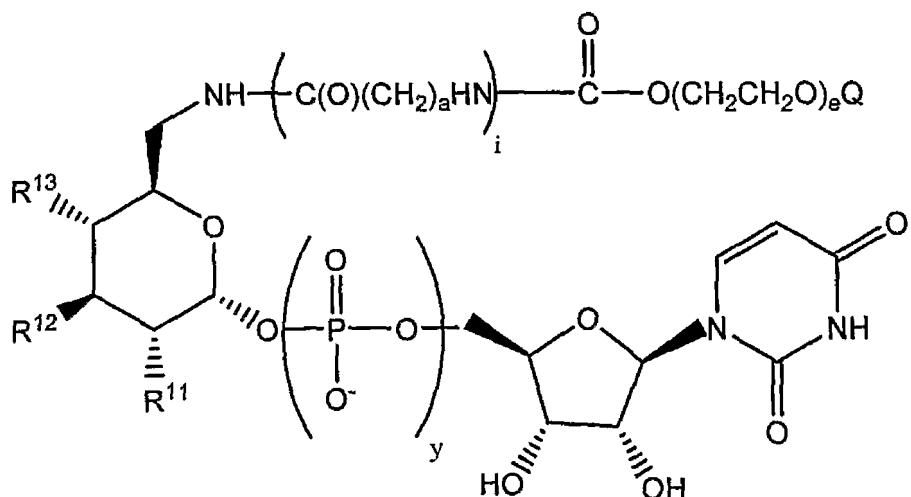
別の代表的な実施形態において、ヌクレオチド糖はグルコースの立体化学に基づく。本実施形態による代表的な種は式

【化 6 6】



10

; および



20

30

を有する。

【0221】

一般に、糖部分または糖部分 - リンカーカセットおよびPEGまたはPEG - リンカーカセット基は、連結方法によって一般的に新しい有機官能基または未反応種に変換されている反応基の使用により連結されている。糖反応官能基は、糖部分の任意の位置に配置されている。本発明の実施において有用な反応基および反応クラスは一般にバイオコンジュゲート化学の当業界で公知であるものである。反応糖部分で利用可能な反応の現在好ましいのは、比較的温和な条件下に行われるものである。これらには、求核置換反応（例えば、アミンおよびアルコールのアシルハロゲン化物、活性エステルとの反応）、求電子置換反応（例えば、エナミン反応）、および炭素 - 炭素および炭素 - ヘテロ原子多重結合へ付加（例えば、マイケル反応、ディールス・アルダー付加）が含まれるが、これらに限定されない。これらおよび他の有用な反応は、例えば、マーチ (March)、ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY、第3版、ジョン・ワイリー・アンド・サンズ (John Wiley & Sons)、New York、1985年、ヘルマンソン (Hermanson)、BIOCONJUGATE TECHNIQUES、アカデミック・プレス (Academic Press)、San Diego、1996年、およびフィーニー (Feeney) ら、MODIFICATION OF PROTEINS, Advances in Chemistry Series, 第198巻、米 40

40

50

国化学会、Washington, D. C.、1982年において議論されている。

【0222】

糖核または修飾基から懸垂する有用な反応官能基としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない。

(a) N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、N-ヒドロキシベンズトリアゾールエステル、酸ハロゲン化物、アシルイミダゾール、チオエステル、p-ニトロフェニルエステル、アルキル、アルケニル、アルキニル、および芳香族エステルを含むが、これらに限定されないカルボキシル基、およびそのさまざまな誘導体、

(b) 例えば、エステル、エーテル、アルデヒド等に変換されうるヒドロキシル基、

(c) ハロゲン化物が後に、例えば、アミン、カルボン酸アニオン、チオールアニオン、カルバニオン、またはアルコキシドイオンなどの求核基で置換され、それによって結果としてハロゲン原子の官能基で新しい基の共有結合が生じうるハロアルキル基、 10

(d) 例えば、マレイミド基など、ディールス・アルダー反応に関与できる求ジエン基、

(e) その後の誘導体化が、例えば、イミン、ヒドラゾン、セミカルバゾン、またはオキシムなどカルボニル誘導体によって、またはグリニュール付加もしくはアルキルリチウム付加などの機序によって可能であるアルデヒドまたはケトン基、

(f) 例えば、スルホンアミドを形成するその後のアミンとの反応のためのスルホニルハロゲン化物基、

(g) 例えば、ジスルフィドに変換され、またはアシルハロゲン化物と反応されうるチオール基、 20

(h) 例えば、アシル化、アルキル化、または酸化されうるアミンまたはスルフヒドリル基、

(i) 例えば、シクル付加、アシル化、マイケル付加等を受けうるアルケン、および

(j) 例えば、アミンおよびヒドロキシル化合物と反応しうるエポキシド。

【0223】

反応官能基は、それらが反応糖核または修飾基をアセンブルするために必要な反応に関与することがなく、またはこれを阻害することがないように選択される。あるいは、反応官能基は保護基の存在によって反応に関与することから保護されうる。当業者は、それが選ばれた一連の反応条件に干渉しないように特定の官能基を保護する方法を理解している。有用な保護基については、例えば、グリーン(Greene)ら、PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS、ジョン・ワイリー・アンド・サンズ(John Wiley & Sons)、New York、1991年を参照。 30

【0224】

次の議論において、本発明の実施において有用な修飾糖の多くの特定の実施例が記載されている。代表的な実施形態において、シアル酸誘導体は、修飾基が結合される糖核として使用される。シアル酸誘導体への議論の焦点が説明の明確さに限定され、本発明の範囲を制限するに考えるべきではない。当業者は、さまざまな他の糖部分が、一例としてシアル酸の使用が記載されているものと類似の方法で活性化および誘導体化されることを十分に理解するであろう。例えば、当技術分野で承認されている方法によって容易に修飾される糖物質の2~3の例を挙げると、修飾ガラクトース、グルコース、N-アセチルガラクトサミンおよびフコースについて多数の方法が利用可能である。例えば、エルハラビ(Elhalabi)ら、Curr. Med. Chem. 6: 93 (1999年)、およびシェーファー(Schafer)ら、J. Org. Chem. 65: 24 (2000年)を参照。 40

【0225】

代表的な実施形態において、修飾糖は6-アミノ-N-アセチル-グリコシル部分に基づく。N-アセチルガラクトサミンについて図5に示されているように、6-アミノ糖部分は標準方法によって容易に調製される。 50

【0226】

上記のスキームにおいて、指数 n は 1 ~ 2500 の整数を表す。代表的な実施形態において、この指数は、ポリマーが分子量において約 10 kD、15 kD、または 20 kD であるように選択される。記号「A」は活性化基、例えば、ハロ、活性化エカルテルの成分（例えば、N-ヒドロキシスクシンイミドエカルテル）、炭素酸の成分（例えば、p-ニトロフェニル炭酸塩）などを表す。当業者は、他の PEG-アミドヌクレオチド糖がこれや類似の方法によって容易に調製されることを十分に理解する。

【0227】

受容体ペプチドは一般的にデノボ合成され、または原核細胞（例えば、大腸菌（E. coli）などの細菌細胞）または哺乳類、酵母、昆虫、真菌、または植物細胞など真核細胞において組換え発現される。ペプチドは完全長タンパク質または断片のいずれかである。さらに、ペプチドは、野生型または変異ペプチドでありうる。代表的な実施形態において、ペプチドは、1つもしくはそれ以上のNまたはO連結グリコシル化部位をペプチド配列に付加する変異を含む。

【0228】

本発明の方法は、組換え製造される不完全にグリコシル化したペプチドの修飾も提供する。多くの組換え製造された糖タンパク質は不完全にグリコシル化され、望ましい特性、例えば、RESによって認識される免疫原性を有しうる炭水化物残基を露出する。本発明の方法における修飾糖を使用することにより、ペプチドは、例えば、水溶性ポリマー、治療的薬剤、または同様のもので同時にさらにグリコシル化および誘導体化されうる。修飾糖の糖部分は、完全にグリコシル化されたペプチドにおける受容体、または所望の特性を有する別の糖部分に適切にコンジュゲートされる残基でありうる。

【0229】

当業者は、本発明が、すべての供給源の実質的にすべてのペプチドまたは糖ペプチドを使用することにより実施されうる。本発明はそれにより実施されうる代表的ペプチドは、国際公開第03/031464号パンフレット、および本明細書に記載されている文献に記載されている。

【0230】

本発明の方法によって修飾されるペプチドは合成され、もしくは野生型ペプチドであり、またはそれらは、部位特異的突然変異生成など当業界で周知の方法によって製造される変異化ペプチドでありうる。ペプチドのグリコシル化は一般的にN連結またはO連結のいずれかである。代表的なNリンケージはアスパラギン残基の側鎖との修飾糖の結合である。トリペプチド配列アスパラギン-X-セリンおよびアスパラギン-X-トレオニンは、ここでXはプロリン以外のアミノ酸であり、アスパラギン側鎖との炭水化物部分の酵素結合の標識配列である。したがって、ポリペプチドカセットにおけるこれらトリペプチド配列のいずれかにおける存在は、グリコシル化部位の可能性をもたらす。O連結グリコシル化は、1つの糖（例えば、N-アセチルガラクトサミン、ガラクトース、マンノース、Galactose、グルコース、フコース、キシロース）のヒドロキシアミノ酸、好ましくは、セリンまたはトレオニンのヒドロキシ側鎖との結合を指すが、異常なまたは非天然アミノ酸、例えば、5-ヒドロキシプロリンまたは5-ヒドロキシリシンも使用されうる。

【0231】

さらに、ペプチドに加えて、本発明の方法は他の生物構造物（例えば、糖脂質、脂質、スフィンゴイド、セラミド、グリコシル化部位を含有する全細胞など）で実施されうる。

【0232】

グリコシル化部位のペプチドまたは他の構造物への付加は、それが1つもしくはそれ以上のグリコシル化部位を含有するようにアミノ酸配列を変更することによって便利に行われる。付加は、-OH基、好ましくは、セリンまたはトレオニン残基を示す1つもしくはそれ以上の種のペプチドの配列内の（O連結グリコシル化部位に対して）組込みによっても行われうる。付加は、ペプチドの突然変異または完全化学合成によって行われうる。ペプチドアミノ酸配列は、好ましくは、DNAレベルでの変化により、詳しくは、所望のア

10

20

30

40

50

ミノ酸へ翻訳するコドンが生成されるように所定の塩基でペプチドを符号化するDNAを突然変異させることによって変更される。DNA突然変異は、好ましくは、当業界で周知の方法を使用することによって行われる。

【0233】

代表的な実施形態において、グリコシル化部位は、ポリヌクレオチドをシャフリングすることによって付加される。候補のペプチドを符号化するポリヌクレオチドは、DNAシャフリングプロトコールで調節されうる。DNAシャフリングは、関連遺伝子のプールのランダム断片化の後、ポリメラーゼ連鎖反応状方法による断片の再アセンブリによって行われる再帰的組換えおよび突然変異の方法である。例えば、ステマー (S temmer) 、 Proc. Natl. Acad. Set. USA 91 : 10747 - 10751 頁 (1994) 、ステマー (S temmer) 、 Nature 370 : 389 - 391 頁 (1994) 、および米国特許第 5,605,793 号明細書、同第 5,837,458 号明細書、同第 5,830,721 号明細書、および同第 5,811,238 号明細書を参照。

10

【0234】

本発明がそれにより実施されうる代表的なペプチド、グリコシル部位を付加または除去、およびグリコシル構造または基礎構造の付加および除去の方法は、国際公開第 03/031464 号パンフレットおよび関連米国および PCT 出願に詳細に記載されている。

【0235】

本発明は、1つもしくはそれ以上の選択グリコシル残基をペプチドに付加 (またはペプチドから除去) するステップも活用し、その後に修飾糖がペプチドの選択グリコシル残基の少なくとも1つにコンジュゲートされる。本実施形態は、例えば、ペプチドに存在しないか、または所望の量で存在しない選択グリコシル残基に修飾糖をコンジュゲートすることが望ましい場合に有用である。したがって、修飾糖をペプチドに結合する前に、選択されたグリコシル残基は酵素または化学結合によってペプチドにコンジュゲートされる。別の実施形態において、糖ペプチドのグリコシル化パターンは、糖ペプチドからの炭水化物残基の除去によって修飾糖のコンジュゲーション前に変更される。例えば、国際公開第 98/31826 号パンフレットを参照。

20

【0236】

糖ペプチドに存在する炭水化物の付加または除去は化学的または酵素的に行われる。代表的な化学的脱グリコシル化は、ポリペプチド変異形の化合物トリフルオロメタンスルホン酸、または同等の化合物への曝露によってもたらされる。この処置の結果、連結糖 (N - アセチルグルコサミンまたは N - アセチルガラクトサミン) を除きほとんど、またはすべての糖の開裂が生じるが、ペプチドを無傷のままにする。化学的脱グリコシル化は、ハキムジン (Hakimuddin) ら、 Arch. Biochem. Biophys. 259 : 52 頁 (1987 年) およびエッジ (Edge) ら、 Anal. Biochem. 118 : 131 頁 (1981 年) によって記載されている。ポリペプチド変異形における炭水化物部分の酵素的開裂は、トタクラ (Thotakura) ら、 Meth. Enzymol. 138 : 350 頁 (1987 年) によって記載されている通りさまざまなエンド - およびエキソグリコシダーゼの使用によって行われる。

30

【0237】

代表的な実施形態において、ペプチドは、ペプチド上で糖コンジュゲーションまたは再構築ステップを行う前にノイラミダーゼで基本的に完全に脱シリアル化される。糖コンジュゲーションまたは再構築ステップ後、ペプチドは、場合により、シアリルトランスフェラーゼを使用して再シリアル化される。代表的な実施形態において、再シリアル化は基本的にシリアル受容体の集団における各々 (例えば、> 80%、好ましくは、85% 以上、90% 以上、好ましくは、95% 以上、かつより好ましくは、96%、97%、98%、または 99% 以上) 末端のサッカリール受容体で起こる。好ましい実施形態において、サッカリドは実質的に均一のシリアル化パターン (すなわち、実質的に均一のグリコシル化パターン) を有する。

【0238】

40

50

グリコシル部分の化学的付加は、当技術分野で承認されている方法によって行われる。糖部分の酵素的付加は、好ましくは、本明細書に記載の方法の修飾を使用し、本発明において使用される修飾糖の天然グリコシル単位を置換することによって行われる。糖部分を付加する他の方法は、米国特許第5,876,980号明細書、同第6,030,815号明細書、同第5,728,554号明細書、および同第5,922,577号明細書に開示されている。

【0239】

選択グリコシル残基の代表的な結合点としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない。すなわち、(a) N連結グリコシル化のコンセンサス部位、およびO連結グリコシル化の部位、(b) グリコシルトランスフェラーゼの受容体である末端のグリコシル部分、(c) アルギニン、アスパラギン、およびヒスチジン、(d) 遊離カルボキシル基、(e) システインのものなど遊離スルフヒドリル基、(f) セリン、トレオニン、またはヒドロキシプロリンのものなど遊離ヒドロキシル基、(g) フェニルアラニン、チロシン、またはトリプトファンのものなど芳香族残基、または(h) グルタミンのアミド基。本発明において使用される代表的な方法は、1987年9月11日発行の国際公開第87/05330号パンフレット、およびアプリン(Aplin)とリストン(Wriston)、CRC CRIT. REV. BIOCHEM.、259-306頁(1981年)に記載されている。

【0240】

1つの実施形態において、本発明は、2つもしくはそれ以上のペプチドを、連結基を通じて連結するための方法を提供する。連結基は有用な構造であり、直鎖および分岐鎖構造から選択されうる。好ましくは、ペプチドの結合したリンカーの各々の末端は、修飾糖(すなわち、新生無傷グリコシル連結基)を含む。

【0241】

本発明の代表的な方法において、2つのペプチドは、ポリマーを含むリンカー(例えば、PEGリンカー)によって連結されている。構成物は、上記の図に記載されている一般構造に一致する。本明細書に記載されている通り、本発明の構成物は2つの無傷グリコシル連結基(すなわち、 $s + t = 1$)を含む。2つのグリコシル基を含むPEGリンカーへの焦点は、明確さのためであり、本発明の本実施形態において使用されるリンカー腕の同一性の制限と解釈すべきではない。

【0242】

したがって、PEG部分は第1のグリコシル単位により第1の末端で、および第2のグリコシル単位により第2の末端で官能化される。第1および第2のグリコシル単位は、好ましくは、異なるトランスフェラーゼの基質であり、それぞれ、第1および第2のペプチドの第1および第2のグリコシル単位との直交の結合を可能にする。実際には、(グリコシル)¹-PEG-(グリコシル)²リンカーは、第1のグリコシル単位が基質である第1のペプチドおよび第1のトランスフェラーゼと接触し、それによって(ペプチド)¹-(グリコシル)¹-PEG-(グリコシル)²を形成する。次いで、トランスフェラーゼおよび/または未反応ペプチドは、場合により、反応混合物から除去される。第2のグリコシル単位が基質である第2のペプチドおよび第2のトランスフェラーゼは、(ペプチド)¹-(グリコシル)¹-PEG-(グリコシル)²コンジュゲートに付加され、(ペプチド)¹-(グリコシル)¹-PEG-(グリコシル)²-(ペプチド)²を形成し、グリコシル残基の少なくとも1つは直接または間接のいずれかのO連結である。当業者は、上記の方法が、例えば、分岐PEG、デンドリマー、ポリ(アミノ酸)、ポリサッカリド、または同様のものを使用することによって、3つ以上のペプチド間のコンジュゲートの形成にも提供可能であることを十分に理解するであろう。

【0243】

代表的な実施形態において、本発明の方法によって修飾されるペプチドは、哺乳類細胞(例えば、CHO細胞)またはトランスジェニック動物において生成される糖ペプチドであり、したがって、Nおよび/またはO連結オリゴ糖鎖を含有し、これらは不完全にシア

10

20

30

40

50

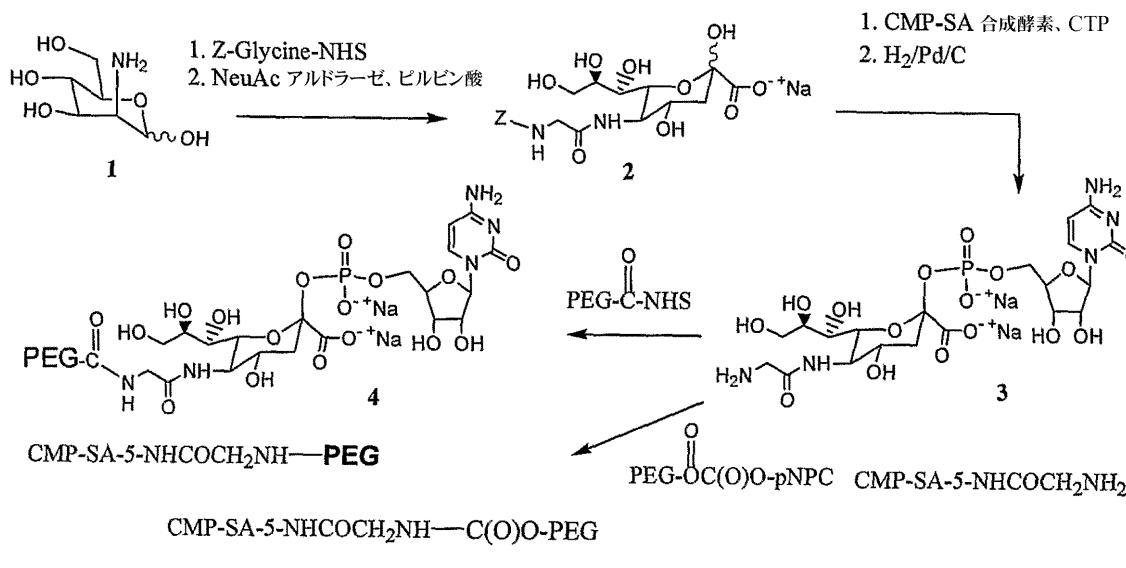
リル化される。シアル酸を欠き、かつ末端のガラクトース残基を含有する糖ペプチドのオリゴ糖鎖は、PEG化、PPG化され、または修飾シアル酸で修飾されうる。

【0244】

スキーム1において、アミノグリコシド1は、保護アミノ酸（例えば、グリシン）誘導体の活性エステルで処理され、糖アミノ酸残基を対応する保護アミノ酸アミド付加化合物へ変換する。この付加化合物はアルドラーゼで処置され、-ヒドロキシカルボン酸塩2を形成する。化合物2は、CMP-SA合成酵素の作用の後、CMP誘導体の触媒水素化によって対応するCMP誘導体に変換され、化合物3を生成する。グリシン付加化合物の形成によって導入されるアミンは、化合物3を活性化PEGまたはPPG誘導体（例えば、PEG-C(O)NHS、PEG-O-C(O)O-p-ニトロフェニル）と反応させることによってPEG結合の位置として使用され、それぞれ、4または5などの種を生成する。

【化67】

スキーム1



【0245】

修飾糖のペプチドへのコンジュゲーション

PEG修飾糖は、コンジュゲーションを媒介する適切な酵素を使用してグリコシル化または未グリコシル化ペプチドへコンジュゲートされる。好ましくは、修飾ドナー糖、酵素、および受容体ペプチドの濃度は、受容体が消費されるまでグリコシル化が継続するように選択される。以下で議論される考慮は、シリルトランスフェラーゼとの関連で記載されているが、一般に他のグリコシルトランスフェラーゼ反応にも適用可能である。

【0246】

所望のオリゴ糖構造を合成するグリコシルトランスフェラーゼを使用する多くの方法が周知であり、一般に本発明に適用可能である。代表的な方法は、例えば、国際公開第96/32491号パンフレット、イトウ(Ito)ら、Pure Appl. Chem. 65: 753頁(1993年)、米国特許第5,352,670号明細書、同第5,374,541号明細書、同第5,545,553号明細書、共同所有の米国特許第6,399,336号明細書および同第6,440,703号明細書、および共同所有の公開PCT出願、国際公開第03/031464号パンフレット、国際公開第04/033651号パンフレット、国際公開第04/099231号パンフレットに記載されているが、これらは参照により本明細書で援用される。

【0247】

10

20

30

40

50

本発明は、单一グリコシルトランスフェラーゼまたはグリコシルトランスフェラーゼの組合せを使用して実施される。例えば、シリルトランスフェラーゼとガラクトシルトランスフェラーゼの組合せが使用されうる。2つ以上の酵素を使用する実施形態においては、酵素および基質は、好ましくは、初期反応混合物において混合され、または第2の酵素反応の酵素および試薬は、第1の酵素反応が完了またはほぼ完了すると反応培地に添加される。单一容器中で順に2つの酵素反応を行うことによって、全体的収率は、中間種が単離される方法を超えて改善される。さらに、余分な溶媒および副産物の清掃および除去が削減される。

【0248】

好ましい実施形態において、第1および第2の酵素の各々はグリコシルトランスフェラーゼである。別の好ましい実施形態において、1つの酵素はエンドグリコシダーゼである。追加の好ましい実施形態において、3つ以上の酵素が使用され、本発明の修飾糖タンパク質をアセンブリする。酵素は、ペプチドへの修飾糖の付加の前後いずれかの時点でペプチド上のサッカリド構造を変更するために使用される。

【0249】

別の実施形態において、この方法は1つもしくはそれ以上のエキソまたはエンドグリコシダーゼを使用する。グリコシダーゼは一般的に、遺伝子操作され、それらを破壊するよりもグリコシル結合を形成する突然変異体である。突然変異グリカナーゼは一般的に活性部位酸性アミノ酸残基のアミノ酸残基の置換を含む。例えば、エンドグリカナーゼがエンドHである場合、置換活性部位残基は一般的に位置130でAsp、位置132でGluまたはそれらの組合せとなる。アミノ酸は一般にセリン、アラニン、アスパラギン、またはグルタミンで置換される。

【0250】

変異酵素は、通常、エンドグリカナーゼ加水分解ステップの逆反応と類似である合成ステップによって反応を触媒する。これらの実施形態において、グリコシルドナー分子（例えば、所望のオリゴ-またはモノサッカリド構造）は脱離基を含有し、反応はドナー分子のタンパク質上のGlcNAc残基への添加により継続する。例えば、脱離基はフッ化物などのハロゲンでありうる。他の実施形態において、脱離基はAsn、またはAsnペプチド部分である。別の実施形態において、グリコシルドナー分子上のGlcNAc残基は修飾される。例えば、GlcNAc残基は1,2オキサゾリン部分を含んで成りうる。

【0251】

好ましい実施形態において、本発明のコンジュゲートを生成するために使用される酵素の各々は触媒量で存在する。特定の酵素の触媒量が酵素の基質の濃度のほか、温度、時間、およびpH値など反応条件によって変動する。予め選択された基質濃度および反応条件下の所定の酵素の触媒量を決定する手段は当業者に公知である。

【0252】

上記の方法が行われる温度は氷点下のすぐ上から最も感受性の酵素が変性する温度までの範囲でありうる。好ましい温度範囲は、約0～約55、かつより好ましくは、約20～37である。別の代表的な実施形態において、本方法の1つもしくはそれ以上の成分は、好熱性酵素を使用する高温で行われる。

【0253】

反応混合物は、受容体はグリコシル化されるのに十分な時間にわたって維持され、それによって所望のコンジュゲートを形成する。コンジュゲートの一部はしばしば数時間後に検出されうるが、回収可能な量が通常、24時間以内に得られる。当業者は、反応速度が、選択される系に対して最適化される多くの変動要因（例えば、酵素濃度、ドナー濃度、受容体濃度、温度、溶媒容積）によって左右されることを理解する。

【0254】

本発明は、修飾ペプチドの工業規模の製造をも提供する。本明細書で使用される工業規模は一般に少なくとも1グラムの完成した精製コンジュゲートをもたらす。

【0255】

10

20

20

30

40

50

次の議論において、本発明は、修飾シアル酸部分のグリコシル化ペプチドとのコンジュゲーションによって例示される。代表的な修飾シアル酸は P E G で標識される。次の議論の P E G 修飾シアル酸およびグリコシル化ペプチドの使用への焦点は説明の明確さのためであり、本発明がこれら 2 つのパートナーのコンジュゲーションに限定されることを意味することは意図されていない。当業者は、議論が一般にシアル酸以外の修飾グリコシル部分の付加にも適用可能であることを理解する。さらに、議論は同等に他の P E G 部分、治療的部分、および生体分子を含む P E G 以外の薬剤とともにグリコシル単位の修飾に適用可能である。

【 0 2 5 6 】

酵素方法をペプチドまたは糖ペプチドへの P E G 化または P P G 化炭水化物の選択的導入のために使用されうる。この方法では P E G 、 P P G 、またはマスクした反応官能基を含有する修飾糖が使用され、適切なグリコシルトランスフェラーゼまたはグリコシンターゼと混合される。所望炭水化物リンクエージを作るグリコシルトランスフェラーゼを選択し、ドナー基質として修飾糖を使用することによって、 P E G または P P G は、ペプチドに付加されているペプチド骨格、糖ペプチドの既存の残基、または糖残基へ直接、導入されうる。

【 0 2 5 7 】

代表的な実施形態において、シアリルトランスフェラーゼの受容体が、天然起源構造として、またはそこに組換え、酵素的、もしくは化学的に配置されて修飾すべきペプチド上に存在する。適切な受容体としては、例えば、 G a l 1 1 、 4 G l c N A c 、 G a l 1 1 、 4 G a l N A c 、 G a l 1 1 、 3 G a l N A c 、 ラクト - N - テトラ o s e 、 G a l 1 1 、 3 G l c N A c 、 G a l 1 1 、 3 A r a 、 G a l 1 1 、 6 G l c N A c 、 G a l 1 1 、 4 G l c (ラクトース) などのガラクトシル受容体、および当業者に周知の他の受容体が挙げられる (例えば、パウルソン (P a u l s o n) ら、 J . B i o l . C h e m . 2 5 3 : 5 6 1 7 - 5 6 2 4 頁 (1 9 7 8 年) を参照) 。代表的なシアリルトランスフェラーゼは本明細書に記載されている。

【 0 2 5 8 】

1 つの実施形態において、シアリルトランスフェラーゼの受容体が糖ペプチドのインビオ合成と同時に修飾される糖ペプチド上に存在する。かかる糖ペプチドは、糖ペプチドのグリコシル化パターンの事前の修飾なしに請求された方法を使用してシアリル化されうる。あるいは、本発明の方法を使用し、適切な受容体を含むことのないペプチドをシアリル化することができ、最初にペプチドを修飾し、当業者に周知の方法によって受容体を含める。代表的な実施形態において、 G a l N a c 残基が G a l N a c トランスフェラーゼの作用によって付加される。

【 0 2 5 9 】

代表的な実施形態において、ガラクトシル受容体はガラクトース残基をペプチドに連結した適切な受容体、例えば、 G l c N A c に結合させることによってアセンブリされる。この方法には修飾すべきペプチドを適切な量のガラクトシルトランスフェラーゼ (例えば、 G a l 1 1 , 3 、または G a l 1 1 , 4) 、および適切なガラクトシルドナー (例えば、 U D P - ガラクトース) でインキュベートするステップを含む。反応は実質的に完了するまで継続され、あるいは、反応は、予め選択された量のガラクトース残基が添加されると終了する。選択されたサッカリド受容体をアセンブリする他の方法は当業者には明らかであろう。

【 0 2 6 0 】

さらに別の実施形態において、糖ペプチド連結オリゴ糖が最初に全部または部分的に「トリミングされ」、シアリルトランスフェラーゼの受容体、または 1 つもしくはそれ以上の適切な残基が付加されて適切な受容体を得る部分を曝露する。グリコシルトランスフェラーゼおよびエンドグリコシダーゼなどの酵素 (例えば、米国特許第 5 , 7 1 6 , 8 1 2 号明細書を参照) は、結合およびトリミング反応に有用である。本方法の別の実施形態において、ペプチドのシアル酸部分は基本的に完全に除去され (例えば、少なくとも 9 0 、

10

20

30

40

50

少なくとも 95%、または少なくとも 99%）、修飾シアル酸の受容体を曝露する。

【0261】

次の議論において、本発明の方法はそれに結合される PEG 部分を有する修飾糖の使用によって例示される。議論の焦点は説明の明確さのためである。当業者は、議論が同等に、修飾糖が治療的部分、生体分子、または同様のものを有する実施形態のものと関連することを十分に理解するであろう。

【0262】

炭水化物残基が修飾糖の付加前にトリミングされる本発明の代表的な実施形態において、高マンノースが第1世代の二分岐構造にトリミングバックされる。PEG 部分を有する修飾糖が、「トリミングバック」によって曝露される1つもしくはそれ以上の糖残基にコンジュゲートされる。1つの例において、PEG 部分がPEG 部分にコンジュゲートされた GlcNAc 部分によって付加される。修飾 GlcNAc は、二分岐構造の末端のマンノース残基の一方または両方に結合される。あるいは、未修飾 GlcNAc が分岐種の末端の一方または両方に付加される。

【0263】

別の代表的な実施形態において、PEG 部分が、末端のマンノース残基へ付加された GlcNAc 残基にコンジュゲートされているガラクトース残基を有する修飾糖によって二分岐構造の末端のマンノース残基の一方または両方に付加される。あるいは、未修飾 Gal が末端の GlcNAc 残基の一方または両方に付加される。

【0264】

さらに別の例において、PEG 部分が上記のものなど修飾シアル酸を使用して Gal 残基へ付加される。

【0265】

別の代表的な実施形態において、高マンノース構造がマンノースに「トリミングバック」され、そこから二分岐構造が枝分かれする。1つの例において、PEG 部分がポリマーで修飾された GlcNAc によって付加される。あるいは、未修飾 GlcNAc がマンノースに付加された後、結合 PEG 部分を有する Gal が付加される。さらに別の実施形態において、未修飾 GlcNAc および Gal 残基が連続的にマンノースに付加された後、PEG 部分で修飾されたシアル酸部分が付加される。

【0266】

高マンノース構造は基本トリマンノシリルコアにもトリミングバックされうる。

【0267】

さらに代表的な実施形態において、高マンノースが、第1のマンノース付加されている GlcNAc に「トリミングバック」される。GlcNAc は PEG 部分を有する Gal 残基にコンジュゲートされる。あるいは、未修飾 Gal が GlcNAc に付加された後、水溶性種で修飾されたシアル酸が付加される。さらに別の例において、末端の GlcNAc が Gal でコンジュゲートされ、GlcNAc はその後に PEG 部分を有する修飾フコースでフコシリ化される。

【0268】

高マンノースはペプチドの Asn に結合した第1の GlcNAc にもトリミングバックされうる。1つの例において、GlcNAc - (Fuc)_a 残基の GlcNAc は水溶性ポリマーを有する GlcNAc でコンジュゲートされる。別の例において、GlcNAc - (Fuc)_a 残基の GlcNAc は、水溶性ポリマーを有する Gal で修飾される。さらに別の実施形態において、GlcNAc は Gal で修飾された後、PEG 部分で修飾されたシアル酸の Gal にコンジュゲートされる。

【0269】

他の代表的な実施形態が一般的に認められた米国特許出願刊行物に記載されている。すなわち、米国特許出願公開第 20040132640 号明細書、同第 20040063911 号明細書、同第 20040137557 号明細書、米国特許出願第 10/369,979 号明細書、同第 10/410,913 号明細書、同第 10/360,770 号明細書

10

20

30

40

50

、同第10/410, 945号明細書、および国際公開公報(PCT)第U.S.02/32263号明細書であり、その各々は参照により本明細書で援用される。

【0270】

上記の例は、本明細書に記載の方法の能力の説明を提供する。本明細書に記載の方法を使用することにより、実質的にすべての所望の構造の炭水化物残基を「トリミングバック」し、かつ増加させることが可能である。修飾糖は、上記の通り炭水化物部分の末端に付加され、これはペプチドコアと炭水化物の末端との中間に存在しうる。

【0271】

代表的な実施形態において、既存のシアル酸がシアリダーゼを使用して糖ペプチドから除去され、それによって基礎を成すガラクトシル残基のすべてまたはほとんどを脱マスキングする。あるいは、ペプチドまたは糖ペプチドがガラクトース残基、またはガラクトース単位で終わるオリゴ糖残基で標識される。ガルトース残基の曝露または付加の後、適切なシアリルトランスフェラーゼが修飾シアル酸を付加するために使用される。

10

【0272】

別の代表的な実施形態において、シアル酸をシアル酸へ移動させる酵素が使用される。この方法は、シアリル化グリカンをシアリダーゼで処置し、シアル酸の下にグリカン残基を曝露することなく実施されうる。代表的なポリマー修飾シアル酸がポリ(エチレングリコール)で修飾されたシアル酸である。シアル酸および修飾シアル酸部分をシアル酸残基を含み、グリカン上の既存のシアル酸残基をこれらの種と交換する他の代表的な酵素としては、ST3Gal3、CST-I1、ST8Sia-I1、ST8Sia-I1I、およびST8Sia-IVが挙げられる。

20

【0273】

さらに別の方法において、マスクした反応官能性がシアル酸上に存在する。マスクした反応基は、好ましくは、修飾シアル酸をG-CSFに結合するために使用される条件によって影響を受けない。ペプチドとの修飾シアル酸の共有結合後、マスクは除去され、ペプチドはPEGなどの薬剤でコンジュゲートされる。薬剤は修飾糖残基上の脱マスキングされた反応基とともにその反応によって特殊な方法でペプチドにコンジュゲートされる。

【0274】

修飾糖をその適切なグリコシルトランスフェラーゼとともに、糖ペプチドのオリゴ糖側鎖の末端の糖に応じて使用されうる。上記の通り、PEG化構造の導入のために必要とされる糖ペプチドの末端の糖が発現中に自然に導入され、または発現後に適切なグリコシダーゼ、グリコシルトランスフェラーゼ、またはグリコシダーゼとグリコシルトランスフェラーゼの混合物を使用することにより生成されうる。

30

【0275】

さらに代表的な実施形態において、UDP-ガラクトース-PEGが1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼと反応し、それによって修飾ガラクトースを適切な末端のN-アセチルグルコサミン構造に移動させる。糖ペプチド上の末端のGlcNAc残基は、哺乳類、昆虫、植物、または真菌などの発現系で起こりうるように発現中に生成されるだけではなく、必要に応じて、シアリダーゼおよび/またはグリコシダーゼおよび/またはグリコシルトランスフェラーゼで糖ペプチドを処置することによっても生成されうる。

40

【0276】

別の代表的な実施形態において、GNT1-5などのGlcNAcトランスフェラーゼが使用され、PEG化-GlcNAcを糖ペプチド上の末端のマンノース残基に移動させる。さらに別の代表的な実施形態において、Nおよび/またはO連結グリカン構造が酵素的に糖ペプチドから除去され、アミノ酸または末端のグリコシル残基を曝露し、これはその後に修飾糖とコンジュゲートされる。例えば、エンドグリカナーゼが使用され、糖ペプチドのN連結構造物を除去して末端のGlcNAcをGlcNAc連結Asnとして糖ペプチド上に曝露する。UDP-Gal-PEGおよび適切なガラクトースイルトランスフェラーゼが使用され、PEG-ガラクトース官能性を曝露GlcNAc上に導入する。

【0277】

50

別の実施形態において、修飾糖は直接、糖残基をペプチド骨格に移動することが知られているグリコシルトランスフェラーゼを使用してペプチド骨格に付加される。本発明の実施において有用な代表的なグリコシルトランスフェラーゼとしては、GalNAcトランスフェラーゼ (GalNAcT1-14)、GalcNAcトランスフェラーゼ、フコシルトランスフェラーゼ、グルコシルトランスフェラーゼ、キシロシルトランスフェラーゼ、マンノシルトランスフェラーゼなどが挙げられるが、これらに限定されない。この方法の使用により、炭水化物を欠くペプチド、あるいは、既存の糖ペプチドへの修飾糖の直接の付加が可能となる。両方の場合に、修飾糖の付加は、グリコシルトランスフェラーゼの基質特異性によって規定されるペプチド骨格上の特定の位置で起こり、化学的方法を使用するタンパク質のペプチド骨格の修飾中に起こるようなランダムな方法では起こらない。一連の薬剤が、適切なアミノ酸配列をポリペプチド鎖へ遺伝子操作することによってグリコシルトランスフェラーゼ基質ペプチド配列を欠くタンパク質または糖ペプチドへ導入されうる。

【0278】

上記の代表的な実施形態の各々において、1つもしくはそれ以上の追加の化学的または酵素的修飾ステップが修飾糖のペプチドとのコンジュゲーション後に使用されうる。代表的な実施形態において、酵素（例えば、フコシルトランスフェラーゼ）が使用され、グリコシル単位（例えば、フコース）をペプチドに結合した末端の修飾糖へ付加する。別の例では、酵素反応が使用され、修飾糖がコンジュゲートできなかった部位を「キャップ」する。あるいは、化学反応が使用され、コンジュゲート修飾糖の構造を変更する。例えば、コンジュゲート修飾糖は、修飾糖が結合されているペプチド成分とのそのリンクエージを安定化または不安定化させる薬剤と反応する。別の例では、修飾糖の成分がペプチドとのそのコンジュゲーション後に脱保護される。当業者は、修飾糖がペプチドにコンジュゲートされた後の段階で本発明の方法において有用である一連の酵素的および化学的方法があることを十分に理解するであろう。さらに、修飾糖 - ペプチドコンジュゲートの精緻化が本発明の範囲内である。

【0279】

本発明のコンジュゲートを調製するための酵素および反応条件は、本出願の親および共同所有公開PCT特許出願国際公開第03/031464号パンフレット、国際公開第04/033651号パンフレット、国際公開第04/099231号パンフレットにおいて詳しく述べられている。

【0280】

選択実施形態において、昆虫細胞で発現されるG-CSFペプチドが、再構築糖ペプチド上のグリカンがGalcNAc-Galグリコシル残基を含むように再構築される。GalcNAcおよびGalの付加は、单一容器で別々の反応として、または单一の反応として起こりうる。この例では、GalcNAc-トランスフェラーゼIおよびGal-トランスフェラーゼIが使用される。修飾シアリル部分がS T 3 G a 1 - I I Iを使用して付加される。

【0281】

別の実施形態において、GalcNAc、Gal、および修飾Siaの付加も上記の酵素を使用して单一の反応容器で起こりうる。酵素再構築および糖PEG化ステップの各々は個別に行われる。

【0282】

ペプチドが哺乳類細胞で発現すると、異なる方法が使用される。1つの実施形態において、ペプチドは、修飾シアリル酸をペプチド上のシアリル酸へ移動させ、Sia-Sia-L-R¹を形成し、ペプチド上のシアリル酸を修飾シアリル酸と交換し、Sia-L-R¹を形成するシアリルトランスフェラーゼとペプチドを接触させることによってコンジュゲート前に再構築の必要なしにコンジュゲートされる。本方法において使用される代表的酵素がCST-I Iである。シアリル酸をシアリル酸に付加する他の酵素は当業者に周知であり、かかる酵素の例が本明細書に添付の図面に記載されている。

10

20

30

40

50

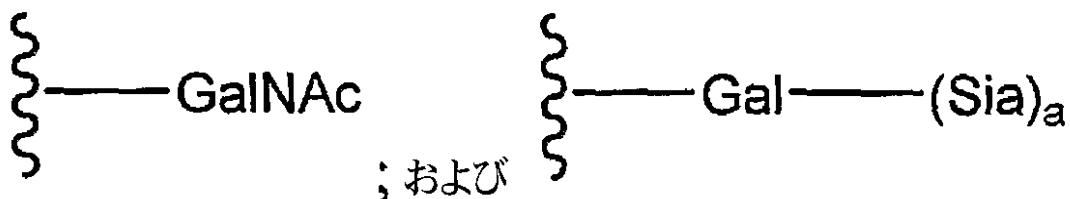
【0283】

本発明のコンジュゲートを調製するさらに別の方において、哺乳類系で発現されるペプチドはシアリダーゼを使用して脱シアリル化される。曝露 Gal 残基は、O 連結グリカンに特異的なシアリルトランスフェラーゼを使用する修飾シアル酸でシアリル化され、O 連結修飾グリカンを有する G-CSF ペプチドを提供する。脱シアリル化、修飾 G-CSF ペプチドは、場合により、ST3Gal I IIなどのシアリルトランスフェラーゼを使用することによって部分的または完全に再シアリル化される。

【0284】

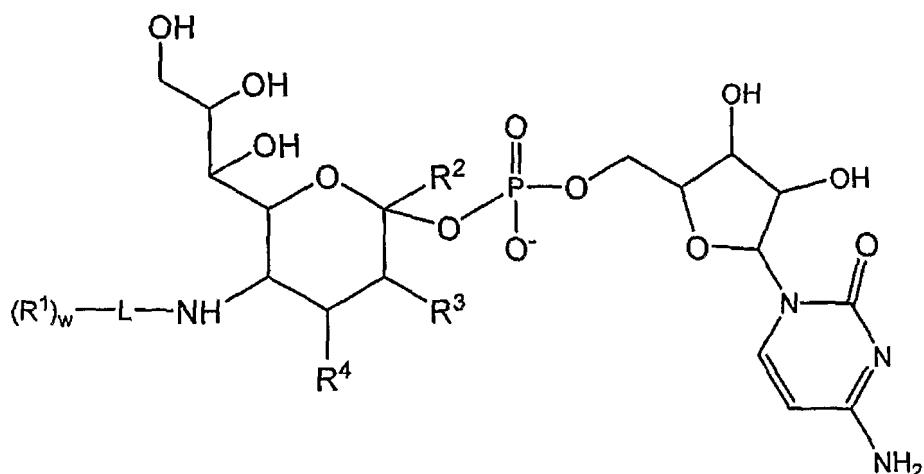
別の態様において、本発明は、本発明のPEG化 G-CSF を製造する方法を提供する。この方法は、(a)

【化68】



から選択されるグリコシル基を含んで成る基質 G-CSF ペプチドを、式

【化69】



を有するPEGシアル酸ドナー、および前記グリコシル基のGalNAc、Gal、およびSia から選択されるメンバーア上へ前記ドナーからPEGシアル酸を移動させる酵素と、前記移動に適切な条件下に接触させるステップを含む。代表的な修飾シアル酸ドナーが、リンカー部分により、ポリマー、例えば、直鎖または分岐ポリ(エチレングリコール)部分で修飾されるCMPシアル酸である。本明細書で論じるように、ペプチドは、場合により、修飾糖を結合させる前にGalNAc および / またはGal および / またはSia とグリコシル化される(「再構築」)。再構築ステップは、ステップ間のグリコシル化ペプチドの精製なしに同じ容器において順に起こりうる。あるいは、1つもしくはそれ以上の再構築ステップの後、グリコシル化ペプチドはそれを次のグリコシル化またはglycPEG化ステップにかける前に精製されうる。

【0285】

実施例に示され、以下に議論されるように、PEG糖の受容体部分の配置が所望数のステップで行われる。例えば、1つの実施形態において、GalNAc のペプチドへの付加

10

20

30

40

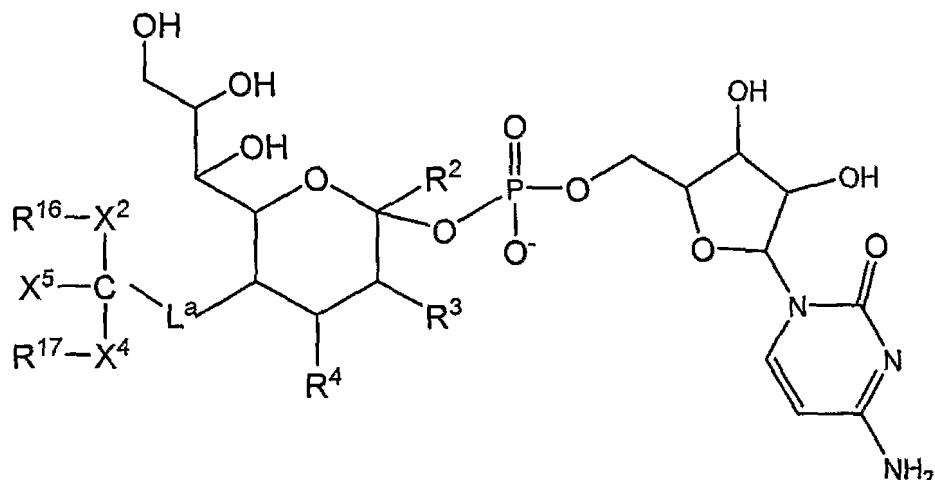
50

の後には第2のステップが続きうるが、ここでPEG糖は同じ反応容器でGalNacにコンジュゲートされる。あるいは、これら2つのステップは単一容器でほぼ同時に行われる。

【0286】

代表的な実施形態において、PEG-シアル酸ドナーは式

【化70】



10

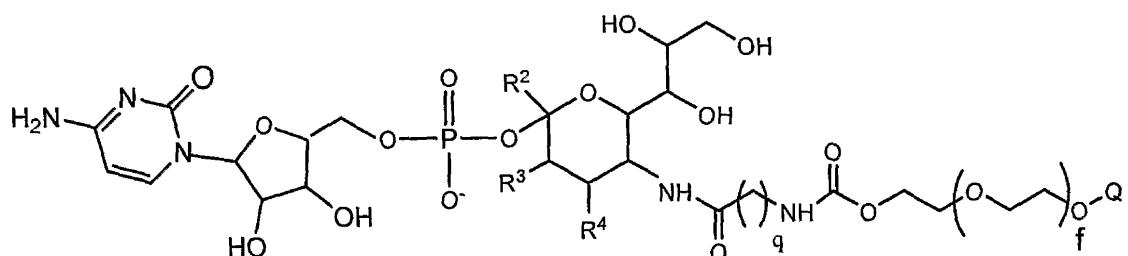
20

を有する。

【0287】

別の代表的な実施形態において、PEG-シアル酸ドナーは式

【化71】



30

を有する。

【0288】

さらに代表的な実施形態において、G-CSFペプチドは糖PEG化または再構築前に適切な発現系で発現される。代表的な発現系としては、Sf9/バキュロウイルスおよびチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞が挙げられる。

40

【0289】

別の代表的な実施形態において、本発明は、コンジュゲートにおけるG-CSFが基本的に非酸化されている本明細書に記載されているものなどG-CSFのコンジュゲートを形成する方法を提供する。PEG-GCSFのメチオニン残基の酸化は、N末端の配列決定およびペプチドマッピングによって検出されうる。酸化またはその不在は、RPHPLCを使用して確認されうる。例えば、RPHPLCを使用することにより、ピークまたは主要なPEG-GCSFピークが検出されたが、これはメチオニンが酸化されている（Met-Ox）PEG-GCSF種を表す。GCSFのこのピークはMet127/Met138酸化として確認されており、主要なピークの0.2分前に溶出する。また、Met122酸化として主要なピークのほぼ3分前に溶出する小さなピークが確認されてい

50

る。Met 1 酸化は、60 法を使用して RP - HPLC によって検出されたが、これは主要なピークと共に溶出する。この N 末端のメチオニン酸化はペプチドマッピングによって検出され、Gl - OX と呼ばれる。

【0290】

したがって、代表的な実施形態において、本発明は、本明細書に記載されている通り、G - C SF コンジュゲートの集団を提供し、ここで 10 % 未満、好ましくは、5 % 未満、より好ましくは、1 % 未満、より好ましくは、0.5 % 未満、さらにより好ましくは、0.1 % 未満、好ましくは、0.05 % 未満、より好ましくは、0.01 % 未満、さらにより好ましくは、0.005 % 未満、およびさらにより好ましくは、0.001 % 未満の集団のメンバーが、Met 127、Met 138、Met 122、N 末端 Met、および酸化されているその組合せから選択されるメチオニン残基を含む。

10

【0291】

本発明による代表的な方法において、修飾糖のペプチドとの酵素コンジュゲーションは、ペプチドのメチオニン残基の酸化を阻止または遅らせる条件下に行われる。代表的な実施形態において、反応混合物は追加のメチオニンを含む。本発明の代表的な方法ではコンジュゲーション反応混合物において約 20 mM までのメチオニンが使用される。

【0292】

G - C SF コンジュゲートの精製

上記の方法で製造される生成物は精製なしに使用されうる。しかし、通常、生成物および 1 つもしくはそれ以上の中間体、例えば、ヌクレオチド糖、分岐および線状 PEG 種、修飾種、および修飾ヌクレオチド糖を回収することが好ましい。薄層または厚層クロマトグラフィー、カラムクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、または膜ろ過などグリコシル化サッカリドの回収のための公知の方法を使用することができる。好ましくは膜ろ過を使用すること、より好ましくは、逆浸透圧膜、または、以下、および本明細書に引用された文献で議論されている回収のための 1 つもしくはそれ以上のカラムクロマトグラフィー法を使用することが好ましい。例えば、膜が約 3000 ~ 約 10,000 の分子量カットオフを有する膜ろ過を使用し、グリコシルトランスフェラーゼなどのタンパク質を除去することができる。次いで、ナノろ過または逆浸透を使用し、塩を除去し、かつ / または生成物サッカリドを精製することができる（例えば、国際公開第 98 / 15581 号パンフレットを参照）。ナノフィルター膜は、使用される膜に応じて、一価塩を通過させるが、約 100 ~ 約 2,000 ダルトンより大きい多価塩および非荷電溶質保持する逆浸透膜のクラスである。したがって、代表的な用途において、本発明の方法によって調製されたサッカリドは、膜に保持され、夾雜塩は通過する。

20

【0293】

ペプチドが、第 1 のステップとして細胞内で生成される場合は、微粒子デブリ、宿主細胞または溶解断片のいずれかが除去される。糖 PEG 化の後、PEG 化ペプチドは当技術分野で承認されている方法、例えば、遠心分離または限外ろ過によって精製され、場合により、タンパク質は、市販のタンパク質濃度フィルターで濃縮された後、免疫親和性クロマトグラフィー、イオン交換カラム分別（例えば、ジエチルアミノエチル (DEAE) 上またはカルボキシメチルもしくはスルホプロピル基を含有するマトリクス上）、ブルー - セファロースでの、CM ブルー - セファロース、MONO - Q、MONO - S、レンチルレクチン - セファロース、WGA - セファロース、Con A - セファロース、エーテルトヨパール、ブチルトヨパール、フェニルトヨパール、またはタンパク質 A セファロースでのクロマトグラフィー、SDS - PAGE クロマトグラフィー、シリカクロマトグラフィー、クロマト焦点化、逆相 HPLC（例えば、追加脂肪族基を有するシリカ）、例えば、セファデックス分子篩またはサイズ排除クロマトグラフィーを使用するゲルろ過、選択的にポリペプチドを結合するカラム上のクロマトグラフィー、およびエタノールまたは硫酸アンモニウム沈殿から選択される 1 つもしくはそれ以上のステップによってポリペプチド変異形を他の不純物から分離する。

30

【0294】

40

50

培養で生成される修飾糖ペプチドは通常、細胞、酵素等からの初期抽出の後、1つもしくはそれ以上の濃縮、塩析、水性イオン交換、またはサイズ排除クロマトグラフィーのステップによって単離される。また、修飾糖タンパク質は親和性クロマトグラフィーによって精製されうる。最後に、HPLCは最終精製ステップのために使用されうる。

【0295】

プロテアーゼ阻害剤、例えば、メチルスルホニルフッ化物(PMSF)を、前記ステップのいずれかに含め、タンパク質分解を阻害することができ、抗生物質または保存剤を含め、付隨的汚染物質の成長を阻止することができる。

【0296】

別の実施形態により、発明の修飾糖ペプチドを生成する系からの上清を、市販のタンパク質濃度フィルター、例えば、アミコン(Amicon)またはミリポア(Millipore)限外ろ過ユニットを使用して最初に濃縮する。濃縮ステップの後、濃縮物は適切な精製マトリックスに適用されうる。例えば、適切な親和性マトリックスが、ペプチドのリガンド、適切な担体に結合したレクチンまたは抗体を含んで成りうる。あるいは、陰イオン交換樹脂、例えば、懸垂DEAE基を有するマトリックスまたは基質が使用されうる。適切なマトリックスとしては、アクリルアミド、アガロース、デキストラン、セルロース、またはタンパク質精製において一般的に使用される種類が挙げられる。あるいは、陽イオン交換ステップが使用されうる。適切な陽イオン交換としては、スルホプロピルまたはカルボキシメチル基を含んで成るさまざまな不溶性マトリックスが挙げられる。

【0297】

精製において使用される他の方法としては、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、およびブルーセファロースでのクロマトグラフィーが挙げられる。これらおよび他の有用な方法は、同時譲渡米国特許第(代理人整理番号第40853-01-5168-P1、2005年5月6日出願)において説明されている。

【0298】

疎水性RP-HPLC培地、例えば、懸垂メチルまたは他の脂肪族基を有するシリカゲルを有する1つもしくはそれ以上のRP-HPLCステップを使用し、さらにポリペプチドコンジュゲート組成物を精製することができる。さまざまな組合せで前記精製ステップの一部または全部を使用し、同種または基本的に同種の修飾糖タンパク質を提供することもできる。

【0299】

大規模発酵に由来する本発明の修飾糖ペプチドは、ウルダル(Urdal)ら、J.C. chromatog. 296: 171頁(1984年)によって開示されたものと類似の方法によって精製されうる。この文献では、調製HPLCカラムでの組換えヒトIL-2の精製のための2つの連続的RP-HPLCステップが記載されている。あるいは、親和性クロマトグラフィーなどの方法を使用し、修飾糖タンパク質を精製することができる。

【0300】

代表的な実施形態において、精製は、一般的に所有される、同時譲渡米国特許第60/665,588号明細書、2005年3月24日出願に記載されている方法によって行われる。

【0301】

別の代表的な実施形態において、精製は溶離剤として適切な緩衝液を使用するSephadexクロマトグラフィーによって達成される。代表的な緩衝液としては、クエン酸および酢酸緩衝液が挙げられるが、クエン酸が現在、好ましい。

【0302】

さらに代表的な実施形態において、リン酸塩、例えば、リン酸ナトリウムが酵素コンジュゲーション反応混合物に添加される。反応混合物は遠心分離され、結果として生じる混合物はSephadexによって精製される。

本実施形態において、GCSEに共有結合していない遊離メチオンが、精製ステップ中に

10

20

30

40

50

存在または非存在である。上記の代表的精製方法は結果として、本明細書に記載されている通り、G - C S F コンジュゲートの集団の単離をもたらすが、ここで 10 % 未満、好ましくは、5 % 未満、より好ましくは、1 % 未満、より好ましくは、0.5 % 未満、さらにより好ましくは、0.1 % 未満、好ましくは、0.05 % 未満、より好ましくは、0.01 % 未満、さらにより好ましくは、0.005 % 未満、およびさらにより好ましくは、0.001 % 未満の集団のメンバーが、Met 127、Met 138、Met 122、N 末端 Met、および酸化されているその組合せから選択されるメチオニン残基を含む。

【0303】

さらに別の代表的実施形態において、精製 G - C S F コンジュゲート組成物は G - C S F ペプチドの集団を含み、10 % 未満、好ましくは、5 % 未満、より好ましくは、1 % 未満、より好ましくは、0.5 % 未満、さらにより好ましくは、0.1 % 未満、好ましくは、0.05 % 未満、より好ましくは、0.01 % 未満、さらにより好ましくは、0.005 % 未満、およびさらにより好ましくは、0.001 % 未満のペプチドの集団が、サイズ 10 排除クロマトグラフィーによって測定されるようにペプチド凝集体に結合される。

【0304】

医薬組成物

別の態様において、本発明は医薬組成物を提供する。医薬組成物としては、医薬的に許容される希釈剤、および非天然起源、PEG 部分、治療的部分、または生体分子、およびグリコシル化もしくは未グリコシル化ペプチド間の共有コンジュゲートが挙げられる。ポリマー、治療的部分、または生体分子は、ペプチドおよびポリマー、治療的部分または生体分子の間に挿入され、これらに共有連結した無傷グリコシル連結基によってペプチドにコンジュゲートされる。 20

【0305】

本発明の医薬組成物は、さまざまな薬物送達系において使用されるために適切である。本発明において使用される適切な製剤は、Remington's Pharmaceutical Sciences、マース・パブリッシング・カンパニー (Mace Publishing Company)、Philadelphia、ペンシルベニア州 (PA)、第17版、(1985年)において確認される。薬物送達の方法の簡単な検討については、ランガー (Langer)、Science 249: 1527-1533 頁 (1990年) を参照。 30

【0306】

医薬組成物は、例えば、局所、経口、鼻内、静脈内、頭蓋内、腹腔内、皮下、または筋内投与を含む適切な投与の方法のために形成されうる。皮下注射などの非経口投与のために、担体は、好ましくは、水、食塩水、アルコール、脂肪、ろう、または緩衝液を含んで成る。経口投与のために、上記の担体、またはマニトール、ラクトース、でんぶん、マグネシウムステアリン酸、サッカリンナトリウム、タルカム、セルロース、グルコース、スクロース、およびマグネシウム炭酸塩などの固体担体を使用することができる。生体分解性マイクロスフェア (例えば、ポリ乳酸ポリグリコレート) も本発明の医薬組成物の担体として使用されうる。適切な生体分解性マイクロスフェアが、例えば、米国特許第4,897,268号明細書および同第5,075,109号明細書で開示されている。 40

【0307】

一般に、医薬組成物は非経口、例えば、静脈内投与される。したがって、本発明は、許容される担体、好ましくは、水性担体、例えば、水、緩衝水、食塩水、PBS などに溶解または懸濁された化合物を非経口投与用の組成物を提供する。組成物は、pH 調節および緩衝剤、等張化剤、湿潤剤、界面活性剤などの生理的条件に近づけるために必要な医薬的に許容される補助剤を含有しうる。

【0308】

これらの組成物は、従来の滅菌法によって滅菌され、または滅菌ろ過されうる。結果として生じる水溶液は、使用のためにパッケージされ、または凍結乾燥され、凍結乾燥調製液は投与前に滅菌水性担体と混合される。調製液の pH は一般的に 3 ~ 11、より好まし 50

くは、5～9、最も好ましくは、7～8である。

【0309】

一部の実施形態において、本発明の糖ペプチドは、標準ベシクル形成脂質から形成されるリポソームへ組込まれる。リポソームを調製するさまざまな方法が利用可能であるが、例えば、スゾカ (SzoKa) ら、Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9: 467 頁 (1980 年)、米国特許第 4,235,871 号明細書、同第 4,501,728 号明細書、および同第 4,837,028 号明細書に記載されている通りである。さまざまな標的薬剤 (例えば、本発明のシアリルガラクトシド) を用いてリポソームで標的化することが当業界で公知である (例えば、米国特許第 4,957,773 号明細書、および同第 4,603,044 号明細書を参照)。

10

【0310】

標的薬剤をリポソームに結合するための標準方法が使用されうる。これらの方法は一般に、標的薬剤、または本発明の脂質誘導体化糖ペプチドなど誘導体化親油性化合物の結合のために活性化されうるホスファチジルエタノールアミンなど脂質成分のリポソームへの組込みを含む。

【0311】

標的機序は一般に、標的部分が標的、例えば、細胞表面受容体との相互作用のために利用可能であるような方法で標的薬剤がリポソームの表面上に配置されることが必要である。本発明の炭水化物は、当業者に周知の方法 (例えば、それぞれ、長鎖アルキルハロゲン化物または脂肪酸を有する炭水化物上に存在するヒドロキシル基のアルキル化またはアシル化) を使用してリポソームが形成される前に脂質分子に結合されうる。あるいは、リポソームは、連結部が最初に膜を形成する時点で膜へ組込まれるような方法で構築されうる。連結部は、膜にしっかりと組込まれて固定される親油性部分を有する必要がある。リポソームの水性表面上で化学的に利用可能である反応部も有する必要がある。反応部は、後に付加される標的薬剤または炭水化物との安定した化学結合を形成することが化学的に適切であるように選択される。場合によっては、標的薬剤を連結分子に直接結合させることが可能であるが、ほとんどの場合、橋として作用する第 3 の分子を使用することがより適切であり、したがって、ベシクル表面から三次元的に延びる標的薬剤または炭水化物とともに膜にある連結分子を連結する。

20

【0312】

本発明の方法によって調製される化合物は、診断上の試薬としても使用されうる。例えば、例えば、標識化合物を使用し、炎症を有することが疑われる患者における炎症または腫瘍転移の部位を局在することができる。この用途のために、化合物は ¹²⁵I、¹⁴C、またはトリチウムで標識されうる。

30

【0313】

本発明の医薬組成物において使用される活性成分は、糖PEG化 G-CSF、および刺激顆粒球生成の生物特性を有するその誘導体である。好ましくは、本発明の G-CSF 組成物は、非経口 (例えば、IV、IM、SC、またはIP) 投与される。有効な投与量は、治療される状態および投与経路によって大幅に変動することが予想されるが、活性材料の約 0.1 (約 7U) ~ 100 (約 7000U) μ g / kg 体重の範囲であることが予想される。貧血状態の治療のための好ましい用量は、週 3 回約 50 ~ 約 300 単位 / kg である。本発明はインビボ滞留時間の増大した G-CSF を提供するため、上記投与量は場合により本発明の組成物が投与されると低下される。

40

【0314】

本発明の組成物の調製における種の調製方法は一般にさまざまな特許刊行物、例えば、米国特許出願公開第 20040137557 号明細書、国際公開第 04/083258 号パンフレット、および国際公開第 04/033651 号パンフレットに記載されている。次の実施例は、本発明のコンジュゲート、および方法を説明するために提供されるが、請求される発明を限定するためには提供されていない。

【0315】

50

代表的な実施形態において、本発明は、本明細書に記載されているような、医薬的に許容される担体と組合せたG-CSFコンジュゲートの集団を含む医薬製剤を提供する。本発明の好ましい製剤は、緩衝液、界面活性剤、およびポリオールを含む。

【0316】

代表的な製剤は、約1mg/mL～約100mg/mL、好ましくは、約5mg/mL～約75mg/mL、かつより好ましくは、約10mg/mL～約50mg/mLの量でのペプチドコンジュゲートを含む。

【0317】

代表的な製剤は、約1mM～約100mM、好ましくは、約5mM～約75mM、かつより好ましくは、約10mM～約50mMの濃度で緩衝液を含む。

【0318】

代表的な製剤において、界面活性剤は、約0.00001%～約10%、好ましくは、約0.00005%～約1%、より好ましくは、約0.0001%～約0.1%、より好ましくは、約0.0005%～約0.005%、かつさらにより好ましくは、約0.001%～約0.01%の量で存在する。

【0319】

代表的な製剤において、ポリオールは、約1mg/mL～100mg/mL、好ましくは、約10mg/mL～約75mg/mL、より好ましくは、約15mg/mL～約50mg/mLの量で存在する。

【0320】

代表的な実施形態において、製剤のpHは約3～約7.5、好ましくは、約4～約6.5、かつより好ましくは、約5～約6である。ペプチドコンジュケートの構造がどうであれ、ペプチドのpIの約0.5pH単位の範囲内であるpHで調製されることが一般に好ましい。

【0321】

代表的な実施形態において、界面活性剤はツイーン(Tween)、例えば、ツイーン(Tween)20である。さらに代表的な実施形態において、ポリオールはソルビトールである。別の実施形態において、緩衝液は酢酸ナトリウムである。

【0322】

本発明の代表的な製剤としては、10mM NaOAc、0.003%ツイーン(Tween)20、およびpH4.0での50mg/mLソルビトールの混合物中のG-CSFコンジュゲート(2mg/mL)が挙げられる。

【実施例】

【0323】

実施例1

CHO細胞において生成されるG-CSFの糖PEG化

a. アシアロ顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)の調製

CHO細胞で生成されたG-CSFを50mMトリス50mMトリス-HCl pH7.4、0.15M NaCl、5mM CaCl₂中2.5mgで溶解し、セントリコン・プラス(Centron Plus)20遠心ろ過機中で500μLに濃縮した。溶液を300mU/mLノイラミニダーゼII(Vivrio Choleriae)で16時間32℃下にインキュベートした。反応をモニタリングするために、小アリコートの反応物を適切な緩衝液で希釈し、IEFゲルを実行した。次いで、反応混合物を予め洗浄したN-(p-アミノフェニル)オキサミド酸-アガロースコンジュゲートに添加し(800μL/mL反応容積)、洗浄ビーズを静かに24時間、4℃下に回転した。混合物を10,000rpmで遠心分離し、上清を採集した。ビーズをトリス-EDTA緩衝液で3回、0.4mLのトリス-EDTA緩衝液で1回、0.2mLのトリス-EDTA緩衝液で1回洗浄し、すべての上清をプールした。上清を4℃下、50mMトリス-HCl pH7.4、1M NaCl、0.05%NaN₃に対して透析し、次いでさらに2回、50mMトリス-HCl pH7.4、1M NaCl、0.05%NaN₃に対して透析し

10

20

30

40

50

た。次いで、透析溶液を、セントリコン・プラス20遠心ろ過機を使用して濃縮し、-20下に保存した。IEFゲルの条件をインビトロジエン(Invitrogen)によって供給された方法および試薬に従い実行した。天然および脱シリル化G-CSFの試料を水に対して透析し、MALDI-TOF MSによって分析した。

【0324】

b. G-CSF-(アルファ2,3)-シリル-PEGの調製

脱シリル化G-CSFを50mMトリス-HCl、0.15M NaCl、0.05%NaN₃、pH7.2中2.5mg/mLで溶解した。溶液を1mM CMP-シリル酸-PEGおよび0.1U/mLのST3Gal1で32下、2日間インキュベートした。2日後、反応混合物をPBS緩衝液(pH7.1)を使用し、画分を採集するトソ・ハース(Toso Haas)G3000SW調製カラムを使用して精製した。反応性生物をSDS-PAGEおよびIEF分析を使用してインビトロジエン(Invitrogen)によって供給された方法および試薬に従い分析した。天然およびPEG化G-CSFの試料を水に対して透析し、MALDI-TOF MSによって分析した。

【0325】

c. G-CSF-(アルファ2,8)-シリル-PEGの調製

アルファ2,3-シリル化O連結グリカンを含有するCHO細胞で生成されたG-CSFを50mMトリス-HCl、0.15M NaCl、0.05%NaN₃、pH7.2中2.5mg/mLで溶解した。溶液を1mM CMP-シリル酸-PEGおよび0.1U/mLのCST-IIで32下、2日間インキュベートした。2日後、PBS緩衝液(pH7.1)を使用し、画分ベースを採集するトソ・ハース(Toso Haas)G3000SW調製カラムを使用して反応混合物を精製した。反応性生物をSDS-PAGEおよびIEF分析を使用してインビトロジエン(Invitrogen)によって供給された方法および試薬に従い分析した。天然およびPEG化G-CSFの試料を水に対して透析し、MALDI-TOF MSによって分析した。

【0326】

d. G-CSF(アルファ2,6)-シリル-PEGの調製

O連結GalNAcのみを含有するG-CSFを50mMトリス-HCl、0.15M NaCl、0.05%NaN₃、pH7.2中2.5mg/mLで溶解する。溶液を1mM CMP-シリル酸-PEGおよび0.1U/mLのST6GalNAcIまたはIIで32下、2日間インキュベートした。2日後、PBS緩衝液(pH7.1)を使用し、画分を採集するトソ・ハース(Toso Haas)G3000SW調製カラムを使用して、反応混合物を精製した。反応性生物をSDS-PAGEおよびIEF分析を使用してインビトロジエン(Invitrogen)によって供給された方法および試薬に従い分析した。天然およびPEG化G-CSFの試料を水に対して透析し、MALDI-TOF MSによって分析した。

【0327】

CHO細胞で生成されたG-CSFをアルスロバクター・シリダーゼ(Arthrobacter sialidase)で処理し、次いでSuperdex75でサイズ排除によって精製し、ST3Gal1またはST3Gal2で処理し、次いでCMP-SA-PEG 20kDaで処理した。結果として生じる分子をイオン交換およびゲルろ過によって精製し、SDS-PAGEによる分析により、PEG化が完了したことが明らかにされた。これはO連結グリカンの糖PEG化の最初の証明である。

【0328】

実施例2

2ポットでの2つの酵素法

次の実施例では2つの連続ステップにおけるG-CSF-GalNAc-SA-PEGの調製が例示され、ここで各々の中間生成物は次にステップで使用される前に精製される。

【0329】

10

20

30

40

50

a. GalNAc-T2を使用するG-CSFおよびUDP-GalNAcからのG-CSF-GalNAc(pH 6.2)の調製

パッケージされた緩衝液3.2mL中G-CSF(960mcg)を、UFフィルター(MWCO5K)を使用する限外ろ過によって濃縮し、次いで25mM MES緩衝液(pH 6.2、0.005%NaN₃)1mLで再構成した。UDP-GalNAc(6mg、9.24mM)、GalNAc-T2(40μL、0.04U)、および100mM MnCl₂(40μL、4mM)を次いで添加し、結果として生じる溶液を室温下にインキュベートした。

【0330】

24時間後、MALDIは、反応が完了したことを示した。反応混合物を直接、SEC(Superdex 75およびSuperdex 200)、およびPBS(リン酸緩衝生理食塩水、pH 4.9および0.005%トween(Tween) 80)を含んで成る溶出緩衝液を使用するHPLC精製にかけた。G-CSF-GalNAcの採集ピークをセントリコン(Centricon)5KDa MWCOフィルターを使用して約150μLに濃縮し、PBS(リン酸緩衝生理食塩水、pH 4.9および0.005%トween(Tween) 80)を思量して容積を1mLに調節した。最終タンパク質濃度1mg/mL(A₂₈₀)、収率100%。試料4下に保存した。

【0331】

b. 精製G-CSF-GalNAc、CMP-SA-PEG(20KDa)およびマウスST6GalNAc-I(pH 6.2)を使用するG-CSF-GalNAc-SA-PEGの調製

タンパク質1mgを含有するG-CSF-GalNAc溶液を25mM MES緩衝液(pH 6.2、0.005%NaN₃)へ緩衝液交換し、CMP-SA-PEG(20KDa)(5mg、0.25μmol)を添加した。溶解後、MnCl₂(100μL、100mM溶液)およびST6GalNAc-I(100μL、マウス酵素)を添加し、反応混合物をゆっくり32下に3日間振動させた。反応混合物を限外ろ過(MWCO5K)によって濃縮し、緩衝液を25mM NaOAc(pH 4.9)で1回交換し、次いで全容積1mLに濃縮した。次いで生成物をSP-セファロース(A: 25mM NaOAc + 0.005%トween 80 pH 4.5、B: 25mM NaOAc + 0.005%トween 80 pH 4.5 + 2M NaCl)を保持時間13-18分、SEC(Superdex 75、PBS-pH 7.2、0.005%トween 80)を保持時間8.6分(superdex 75、フロー1mL/分)で使用して精製した。所望の画分を採集し、0.5mLに濃縮し、4下に保存した。

【0332】

実施例3

酵素の同時添加によるG-CSF-GalNAc-SA-PEGを製造する1ポット法

次の実施例では、酵素の同時添加を使用する1ポットでのG-CSF-GalNAc-SA-PEGの調製が例示される

【0333】

a. マウスST6GalNAc-I(pH 6.0)を使用する1ポット法。

G-CSF(生成物精製緩衝液3.2mL中に溶解したタンパク質960μg)を限外ろ過(MWCO5K)によって0.5mLに濃縮し、25mM MES緩衝液(pH 6.0、0.005%NaN₃)で全容積を約1mLまたはタンパク質濃度を1mg/mLに再構成した。UDP-GalNAc(6mg、9.21μmol)、GalNAc-T2(80μL、80mU)、CMP-SA-PEG(20KDa)(6mg、0.3μmol)およびマウス酵素ST6GalNAc-I(120μL)および100mM MnCl₂(50μL)を次いで添加した。溶液を32下に48時間振動させ、SPセファロースで標準クロマトグラフィー条件を使用して精製した。合計0.5mgのタンパク質(A₂₈₀)が得られ、または全体的収率が約50%であった。生成物構造をMALDIおよびSDS-PAGEによる分析によって確認した。

10

20

30

40

50

【0334】

b. ニワトリST6GalNAc-I(pH6.0)を使用する1ポット法。

G-CSF14.4mgを3mL最終容積に濃縮し、25mM MES緩衝液(pH6.0、0.005%NaN₃、0.004%トゥイーン80)で緩衝液交換し、容積を13mLに調節した。UDP-GalNAc(90mg、150μmole)、GalNAc-T2(0.59U)、CMP-SA-PEG-20kDa(90mg)、ニワトリST6GalNAc-I(0.44U)、および100mM MnCl₂(600mCL)を次いで添加した。結果として生じる混合物を室温下に60時間保存した。次いで、反応混合物をUF(MWCO5K)および遠心分離を使用して濃縮した。残留物(約2mL)を25mM NaOAc緩衝液(pH4.5)中に溶解し、再び最終容積5mLに濃縮した。この試料を、SPセファロースを約10-23分間、SEC(Superdex75、17分、流量0.5mL/分)、および追加のSEC(Superdex200、23分、流量0.5mL/分)を使用して精製し、3.6mg(全体的収率25%)のG-CSF-GalNAc-SA-PEG-20kDaを得た(A₂₈₀およびBCA法)。

【0335】

実施例4

酵素の連続的添加によるG-CSF-GalNAc-Gal-SA-PEGを製造する1ポット法

次の実施例では酵素の連続的添加による1ポットでG-CSF-GalNAc-Gal-SA-PEGを製造する方法が例示される。

【0336】

a. GalNAc-G-CSFからの開始

1. GalNAc-T2を使用するG-CSFおよびUDP-GalNAcからのG-CSF-GalNAc(pH6.2)調製

パッケージされた緩衝液3.2mL中G-CSF(960mcg)を、UFフィルター(MWCO5K)を使用する限外ろ過によって濃縮し、次いで25mM MES緩衝液(pH6.2、0.005%NaN₃)1mLで再構成した。UDP-GalNAc(6mg、9.24mM)、GalNAc-T2(40μL、0.04U)、および100mM MnCl₂(40μL、4mM)を次いで添加し、結果として生じる溶液を室温下にインキュベートした。

【0337】

2. G-CSF-GalNAcからのG-CSF-GalNAc-Gal-SA-PEGの調製、UDP-ガラクトース、SA-PEG-20kDa、および適切な酵素

UDP-ガラクトース(4mg、6.5μmole)、コア-1-Gal-T(320μL、160mU)、CMP-SA-PEG-20kDa(8mg、0.4μmole)、ST3Gal2(80μL、0.07mU)および100mM MnCl₂(80μL)を直接、上記a.のステップからの25mM MES緩衝液(pH6.0)1.5mL中G-CSF-GalNAc(1.5mg)の粗反応混合物に添加した。結果として生じる混合物を32下に60時間インキュベートした。反応混合物を遠心分離し、限外ろ過(MWCO5K)を使用して溶液を0.2mLに濃縮し、次いで25mM NaOAc(pH4.5)で再溶解して最終容積を1mLにした。SPセファロース(保持時間10~15分)を使用して生成物を精製し、スピノンフィルター(MWCO5K)を使用してピーク画分を濃縮し、残留物をさらにSEC(Superdex75、保持時間10.2分)を使用して精製した。スピノンフィルター(MWCO5K)を使用する濃縮後、タンパク質をPBS、2.5%マニトール、0.005%ポリソルベート、pH6.5による製剤緩衝液を使用して1mLに希釈し、mL当たり850μgタンパク質のタンパク質濃度で形成した(A₂₈₀)。全体的収率は55%であった。

【0338】

実施例5

酵素の同時添加によるG-CSF-GalNAc-Gal-SA-PEGを製造する1ボ

10

20

30

40

50

ツト法

a. G-CSF からの開始

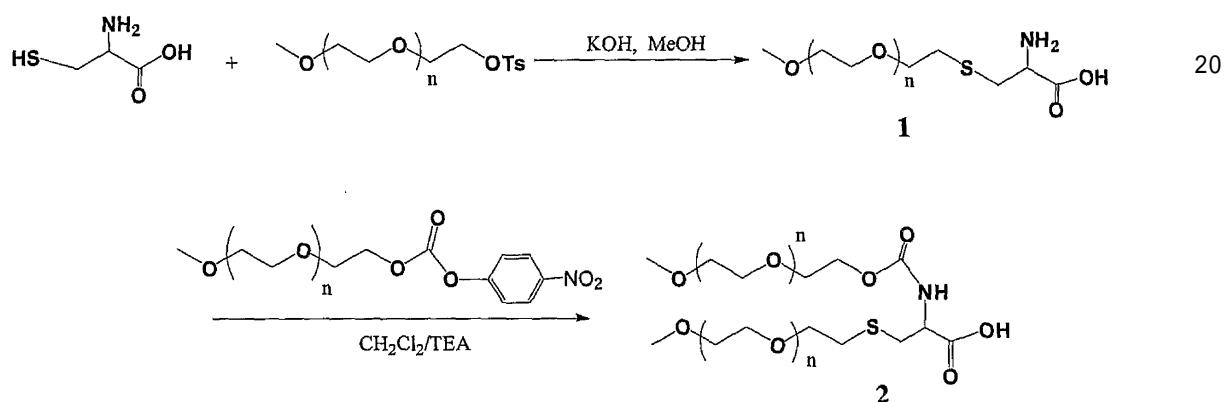
G-CSF (960 mcg、3.2 mL) を限外ろ過 (MWCO 5K) で濃色し、25 mM Mes 緩衝液 (pH 6.0、0.005% NaNO₃) で再構成した。G-CSF 溶液の全容積は約 1 mg/mL であった。UDP-GalNAc (6 mg)、GalNAc-T2 (80 μL、~80 μU)、UDP-Gal (6 mg)、コア1GalT (160 μL、80 μU)、CMP-SA-PEG (20K) (6 mg) およびシアリルトランスフェラーゼ、例えば、ST3Gal1 (160 μL、120 μU)、100 mM MnCl₂ (40 μL) を添加した。結果として生じる混合物を 32 下に 48 時間インキュベートした。IEX および SEC を使用して下記の通り精製を行った。生成物を含有する結果として生じる画分を、限外ろ過 (MWCO 5K) を使用して濃縮し、容積を緩衝液で約 1 mL に調節した。タンパク質濃度は A₂₈₀ によって 0.392 mg/mL であることが判定され、G-CSF からの全体的な収率 40% を示した。

【0339】

実施例 6

システイン-PEG₂ (2) の調製

【化72】



a. 化合物 1 の合成

水酸化カリウム (84.2 mg、1.5 mmol、粉末として) をアルゴン下の無水メタノール (20 L) 中 L-システイン (93.7 mg、0.75 mmol) の溶液に添加した。混合物を室温下に 30 分間攪拌し、次いで分子量 20 キロダルトンの mPEG-O-トシレート (Ts、1.0 g、0.05 mmol) を 2 時間にわたっていくつかの部分で添加した。混合物を室温下に 5 日間攪拌し、ロータリーエバボレーションによって濃縮した。残留物を水 (30 mL) で希釈し、室温下に 2 時間攪拌し、過剰な 20 キロダルトンの mPEG-O-トシレートを破壊した。次いで溶液を酢酸で中和し、pH を pH 5.0 に調節し、逆相クロマトグラフィー (C-18 シリカ) カラム上に装填した。カラムをメタノール / 水のグラジエントで溶出し (生成物は約 70% のメタノールを溶出)、生成物溶出を蒸発光散乱によってモニタリングし、適切な画分を採集し、水 (500 mL) で希釈した。この溶液をクラマトグラフ (イオン交換、XK 50Q、BIG ビーズ、300 mL、水酸化物形態、水の水 / 酢酸に対するグラジエント - 0.75 N)、適切な画分の pH を酢酸で 6.0 に低下させた。次いで、この溶液を逆相カラム (C-18 シリカ) で捕捉し、上記のメタノール / 水のグラジエントで溶出した。生成物画分をプールし、濃縮し、水中に再溶解し、凍結乾燥して 453 mg (44%) の白色固体 (1) を得た。化合物の構造的データは次の通りであった。¹H-NMR (500 MHz, D₂O) δ 2.83 (t, 2H, O-CH₂-CH₂-S)、3.05 (q, 1H, S-CH₂CH₂-CH₂N)、3.18 (q, 1H, (q, 1H, S-CH₂CH₂-CH₂N)、3.38 (s, 3H, CH₃O)、3.7 (t, OCH₂CH₂O)、3.95 (q, 1H, CH₂N)。生成物の純度 50

は S D S P A G E によって確認された。

【 0 3 4 0 】

b . 化合物 2 (システイン - P E G ₂) の合成

トリエチルアミン (約 0 . 5 m L) を溶液が塩基性になるまで無水 C H ₂ C l ₂ (3 0 m L) 中に溶解した化合物 1 (4 4 0 m g 、 2 2 μ m o l) の溶液に滴下した。 C H ₂ C l ₂ (2 0 m L) 中 2 0 キロダルトンの m P E G - O - p - ニトロフェニル炭酸塩 (6 6 0 m g 、 3 3 μ m o l) および N - ヒドロキシスクシンイミド (3 . 6 m g 、 3 0 . 8 μ m o l) の溶液を室温下に 1 時間にわたっていくつかの部分で添加した。反応混合物を室温下に 2 4 時間拡販した。次いで溶媒をロータリーエバボレーションによって除去し、残留物を水 (1 0 0 m L) 中に溶解し、 p H を 1 . 0 N N a O H で 9 . 5 に調節した。塩基性溶液を室温下に 2 時間攪拌し、次いで酢酸で p H 7 . 0 に中和した。次いで、溶液を逆相クロマトグラフィー (C - 1 8 シリカ) 上に装填した。カラムをメタノール / 水のグラジエントで溶出し (生成物は 7 0 % メタノールで溶出する) 、生成物溶出を蒸発光散乱によってモニタリングし、適切な画分を採集し、水 (5 0 0 m L) で希釈した。この溶液をクラマトグラフし (イオン交換、 X K 5 0 Q 、 B I G ビーズ、 3 0 0 m l 、水酸化物形態、水の水 / 酢酸に対するグラジエント - 0 . 7 5 N) 、適切な画分の p H を酢酸で 6 . 0 に低下させた。次いで、この溶液を逆相カラム (C - 1 8 シリカ) で捕捉し、上記のメタノール / 水のグラジエントで溶出した。生成物画分をプールし、濃縮し、水中に再溶解し、凍結乾燥して 5 7 5 m g (7 0 %) の白色固体 (2) を得た。化合物の構造的データは次の通りであった。 ¹ H - N M R (5 0 0 M H z 、 D ₂ O) 2 . 8 3 (t 、 2 H 、 O - C - C H ₂ - S) 、 2 . 9 5 (t 、 2 H 、 O - C - C H ₂ - S) 、 3 . 1 2 (q 、 1 H 、 S - C H H - C H N) 、 3 . 3 9 (s 、 3 H 、 C H ₃ O) 、 3 . 7 1 (t 、 O C H ₂ C H ₂ O) 生成物の純度は S D S P A G E によって確認された。

【 0 3 4 1 】

本明細書に記載の実施例および実施形態は例示目的に限定され、それに照らしてさまざまな修正または変更が当業者には示唆されており、かつ本出願の精神および範囲内ならびに添付の請求項の範囲内に含まれることが理解される。本明細書に引用されたすべての刊行物、特許、および特許出願は、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書で援用される。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 3 4 2 】

【 図 1 】本発明の実施において有用な代表的な修飾シアル酸ヌクレオチドを示す図である。 A . 代表的な分岐 (例えば、 3 0 k D a 、 4 0 k D a) C M P シアル酸 P E G 糖ヌクレオチドの構造。 B . 線状 C M P シアル酸 P E G (例えば、 1 0 k D a) の構造。

【 図 2 】 P E G で誘導体化されたサッカリール部分を添加する前に G - C S F ペプチド上の炭水化物残基が G a l N A c 部分を T h r 1 3 3 (メチオニンが存在する場合には T h r 1 3 4) におけるグリコシル残基に酵素的に添加することによって再構築される本発明の代表的な実施形態を示すスキームである。

【 図 3 】 非 P E G 化 - C S F (A) 、化学的 P E G 化 G - C S F (B) 、および酵素的糖 P E G 化 G - C S F (C) のインビオ滞留寿命の比較を示す図である。

【 図 4 】 図 3 に示されている種の活性の比較を示す図である。

【 図 5 】本発明のコンジュゲートの調製において使用される代表的な P E G グリコシル連結基前駆体 (修飾糖) を製造するための合成スキームを示す図である。

【 図 6 】 代表的な G - C S F アミノ酸配列を示す図である。配列番号 1 は 1 7 5 アミノ酸変異形であり、ここで第 1 のアミノ酸はメチオニンであり、 T h r 1 3 4 にはトレオニン残基がある。配列番号 2 は、主要なメチオニンが欠けていることを除き 1 7 5 アミノ酸変異形と同じ配列を有する 1 7 4 アミノ酸変異形であり、したがって、配列は T で始まり、位置 1 3 3 にはトレオニン残基がある。

【 図 7 】 例えば、修飾シアル酸によりペプチドを糖 P E G 化する、本発明の糖コンジュゲートの形成において使用される代表的なシリルトランスフェラーゼを示す表である。

10

20

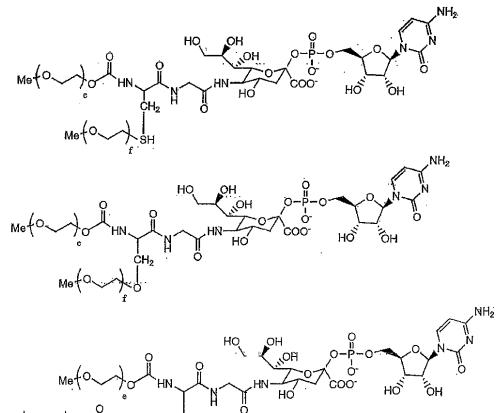
30

40

50

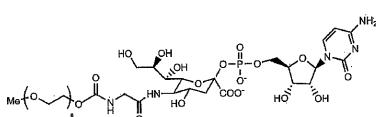
【図1A】

FIGURE 1A



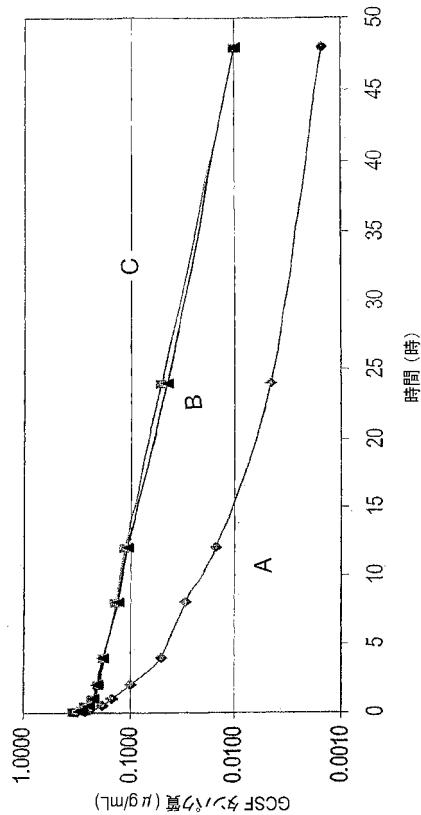
【図1B】

FIGURE 1B



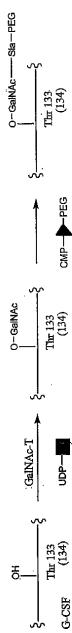
【図3】

図3

ラットにおける^[125]I標識タンパク質のIVボーラス注射

【図2】

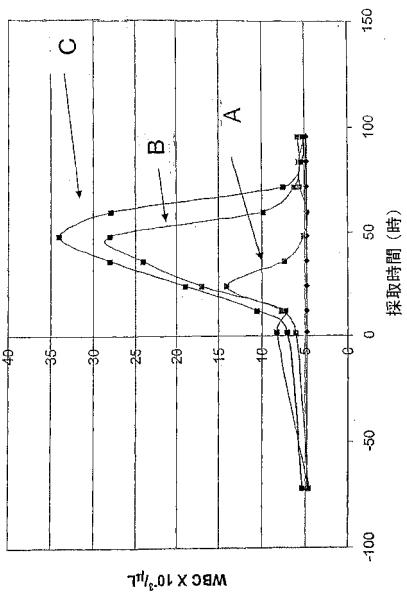
FIGURE 2



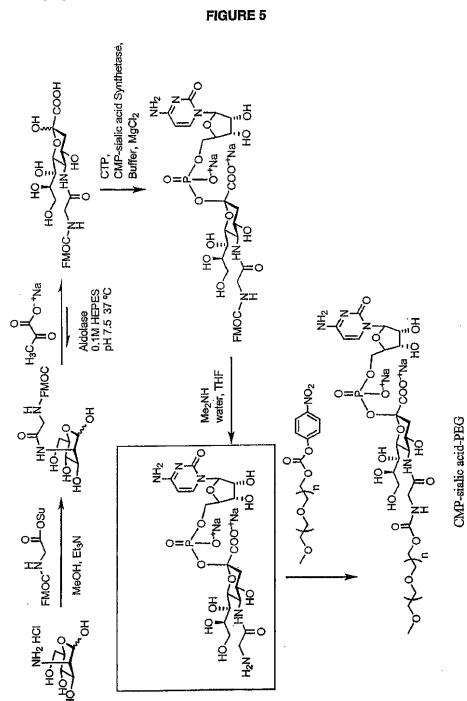
【図4】

図4

0時間で静脈内投与されたGCSF変異形(250μg/kg)に対するマウスWBC反応



【図5】



【図6】

FIGURE 6

175 アミノ酸変異形

MTPLGPASSLPQSFLLKCLEQVRKIQQDGAAIQLQEKLCA
TYKLCHPEELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSPQALQLAGCLSL
QI.HSGLFLYQQLLQALEGISPPLGPTLDTLQLDVADFATI
TIWQQMEELGMAPALQPTQGAMPFAFASAFQRARRAGGVVL
VASHLQSFLFLEVSYRVLRLHQAQP (配列番号1).

174 アミノ酸変異形

TPLGPASSLPQSFLLKCLEQVRKIQQDGAAIQLQEKLCA
KLCHPEELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSPQALQLAGCLSL
HSGLFLYQQLLQALEGISPPLGPTLDTLQLDVADFATI
WQQMEELGMAPALQPTQGAMPFAFASAFQRARRAGGVVL
ASHLQSFLFLEVSYRVLRLHQAQP (配列番号2).

【図7A】

【図7B】

FIGURE 7A

タンパク質	生物	EC#	GenBank / GenPept	SwissProt	PDB / 3D
At1g08280	<i>Arabidopsis thaliana</i>	n.d.	AC011483 B0005485 NM_02962	AAF162411 AAA0426911 NP_1728051	Q54W00 Q5SGD2
At1g08660/T22O13.14	<i>Arabidopsis thaliana</i>	n.d.	AC03081 AY064135 AY124807 NC_008070	AAF9776.1 AAL36042.1 AAT0516.1 NP_172842.1	Q8VZJ0 Q5FRR9
At3g48820/T21J18.90	<i>Arabidopsis thaliana</i>	n.d.	AY060589 AY133916 AL132963 NM_147411	AAE8596.1 AAE91750.1 CAB87910.1 NP_190451.1	Q8RY00 Q8M901
α -2,3-sialyltransferase (ST3Gal-IV)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ654673	CAE48298.1	
α -2,3-sialyltransferase (ST3Gal-V)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ585768	CAE51392.1	
α -2,6-sialyltransferase (St4at7b)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ620551	CAF05850.1	
α -2,6-sialyltransferase (St4at7a)	<i>Bos taurus</i>	2.4.99.8	AJ699418	CAG27880.1	
α -2,6-sialyltransferase (St4at7D)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ699421	CAG27883.1	
α -2,6-sialyltransferase ST3Gal-III (St4at8C)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ704583	CAG28596.1	
CMP α -2,6-sialyltransferase (St6Gal I)	<i>Bos taurus</i>	2.4.99.1	Y15111 NP_803483.1	CAA75385.1 O18974	
sialyltransferase 8 (fragment)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AF450088	AAL47018.1	Q8WN13
sialyltransferase ST3Gal-II (St4at4B)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748841	CAG44450.1	
sialyltransferase ST3Gal-I (St4at4)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748842	CAG44451.1	
sialyltransferase ST3Gal-IV (St4at10)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748843	CAG44452.1	
β -3-galactosamidase α -2,6-sialyltransferase II (St4at11)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ305088	CAC24698.1	Q9BE44
ST3Gal-I	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ620549	CAF05856.1	
ST6GalNAc-VI	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AF381269	AAE18873.1	Q8TT71
CD84	<i>Branchiostoma floridae</i>	n.d.			
polysialyltransferase (PST) (fragment)	<i>Cercopithecus aethiops</i>	2.4.89.-	AF210729	AAF17105.1	Q9TT09
ST3Gal-IV	<i>Cercopithecus aethiops</i>	2.4.99.-	AF210318	AAF17104.1	Q9TT10
polysialyltransferase (STX) (fragment)	<i>Ciona intestinalis</i>	n.d.	AJ626915	CAF25173.1	
ST3Gal-II	<i>Ciona savignyi</i>	n.d.	AJ626814	CAF25172.1	
α -2,3-sialyltransferase ST3Gal-I (St4at4)	<i>Cricetulus griseus</i>	2.4.99.-	Z46801	AAE28634 CAA8822.1	Q64690
polysialyltransferase ST3Gal-IV	<i>Cricetulus griseus</i>	n.d.	AY286675	AAP22942.1	Q86WL0
α -1,3-GlcNAc α -2,6-sialyltransferase ST3Gal-I	<i>Cricetulus griseus</i>	n.d.	AY286676	AAP22943.1	Q86WK9
α -1,3-GlcNAc α -2,6-sialyltransferase ST3Gal-II (fragment)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ783740	CAH04017.1	
α -2,3-sialyltransferase ST3Gal-I (St4at4)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ783741	CAH04018.1	

タンパク質	生物	EC#	GenBank / GenPept	SwissProt	PDB / 3D
α -2,3-sialyltransferase ST3Gal-III (St4at7)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ626821	CAF25179.1	
α -2,3-sialyltransferase ST3Gal-IV (St4at6)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ744809	CAG32845.1	
α -2,3-sialyltransferase ST3Gal-V (St4at5-related)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ783742	CAH04019.1	
α -2,6-sialyltransferase ST6Gal-I (St4at7)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ744801	CAG32837.1	
α -2,6-sialyltransferase ST6GalNAc I (St4at7B)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ634459	CAG25680.1	
α -2,6-sialyltransferase ST6GalNAc VI (St4at7F) (fragment)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ646874	CAG26703.1	
α -2,6-sialyltransferase ST6GalNAc VI (St4at7F) (fragment)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ546883	CAG26712.1	
α -2,6-sialyltransferase ST8Sia I (St4at8) (fragment)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ715535	CAG29374.1	
α -2,6-sialyltransferase ST8Sia II (St4at8C) (fragment)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ715543	CAG29382.1	
α -2,6-sialyltransferase ST8Sia IV (St4at8D) (fragment)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ715545	CAG29384.1	
α -2,6-sialyltransferase ST8Sia V (St4at8E) (fragment)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ715546	CAG29385.1	
α -2,6-sialyltransferase ST8Sia VI (St4at8F) (fragment)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ715551	CAG29390.1	
β -3-galactosamidase α -2,6-sialyltransferase II (St4at11)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ627827	CAF29495.1	
N-glycan α -2,6-sialyltransferase	<i>Danio rerio</i>	n.d.	BC050483 AY65482	AAH5483.1 AAI17875.1	Q7ZU51 Q8QH83
ST3Gal-IV-related (st4at)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	BC053179	AAH53179.1	Q773B9
ST3Gal-V	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ626820 NP_966649.1	CAF25176.1 NP_966649.1	
st6GalNAc-VI	<i>Danio rerio</i>	n.d.	BC060932	AAH6932.1	Q7ZU22
α -2,6-sialyltransferase (CG4871) ST6Gal I	<i>Drosophila melanogaster</i>	2.4.99.1	AE003465 AF218237	AAI17875.1 AAI17875.1	Q8GU23 Q8W121
α -2,3-sialyltransferase ST3Gal-VII	<i>Drosophila melanogaster</i>		AF397532 AE003465	AAK02126.1 AAI07911.1	
α -2,3-sialyltransferase ST3Gal-IV (fragment)	<i>Drosophila melanogaster</i>		AF397532 AE003465	AAI07911.1 NM_079129	
α -2,3-sialyltransferase ST3Gal-IV (fragment)	<i>Drosophila melanogaster</i>		AF397532 AE003465	NP_528553.1 NM_166684	
α -2,3-sialyltransferase ST3Gal-VII	<i>Gallus gallus</i>	n.d.	AJ585767	CAE51391.1	Q92182
α -2,3-sialyltransferase ST3Gal-VII	<i>Gallus gallus</i>	n.d.	AJ627204	CAE51391.1	Q92183
α -2,3-sialyltransferase ST3Gal-I	<i>Gallus gallus</i>	2.4.99.1	X80603	CAA66666.1	Q11200
α -2,3-sialyltransferase ST3Gal-IV (fragment)	<i>Gallus gallus</i>	2.4.99.-	AF035257	AAI14163.1	Q73724
α -2,3-sialyltransferase ST3Gal-II (St4at7b)	<i>Gallus gallus</i>	n.d.	AJ585761	CAE51385.2	
α -2,3-sialyltransferase ST6Gal I	<i>Gallus gallus</i>	2.4.99.1	AJ620653	CAF05952.1	
α -2,6-sialyltransferase ST6Gal I	<i>Gallus gallus</i>	2.4.99.1	X75558	CAA65235.1	Q92182
α -2,6-sialyltransferase ST6Gal I	<i>Gallus gallus</i>	2.4.99.1	NP_205241	NP_990672.1	
α -2,6-sialyltransferase ST6Gal I	<i>Gallus gallus</i>	2.4.99.1	IAAE68026.1	IAAE68026.1	Q92183

【図7C】

FIGURE 7C

タンパク質	生物	EC#	GenBank / GenPept	SwissProt / PDB / 3D
ST6GalNAc I			X74946 AAE58329.1 CAA52902.1 NM_205240 NP_990571.1	
α -2,6-sialyltransferase ST6GalNAc II	<i>Galus galus</i>	2.4.99.-	X77775 AAE68033.1 NM_205233 CAA54813.1 NP_990564.1	Q92184
α -2,6-sialyltransferase ST6GalNAc III (SIAT7C) (fragment)	<i>Galus galus</i>	n.d.	AJ634455 CAG25677.1	
α -2,6-sialyltransferase ST6GalNAc V (SIAT7E) (fragment)	<i>Galus galus</i>	n.d.	AJ646877 CAG26766.1	
α -2,6-sialyltransferase (GD3 Synthase) ST6Sia	<i>Galus galus</i>	2.4.99.-	U73176 AAC28888.1	P79783
α -2,6-sialyltransferase (SIAT9B)	<i>Galus galus</i>	n.d.	AJ699419 CAG27881.1	
α -2,6-sialyltransferase (SIAT9C)	<i>Galus galus</i>	n.d.	AJ699420 CAG27882.1	
α -2,6-sialyltransferase (SIAT8F)	<i>Galus galus</i>	n.d.	AJ699424 CAG27885.1	
α -2,6-sialyltransferase ST6Sia V (SIAT8C)	<i>Galus galus</i>	n.d.	AJ704564 CAG28897.1	
β -galactosamidase α -2,6-sialyltransferase II (ST6Gal II)	<i>Galus galus</i>	2.4.99.-	AY515255 AAS83519.1	
GD3 synthase (SIAT9)	<i>Galus galus</i>	2.4.99.-	AJ008194 AAB95120.1	O42399
α -2,3-sialyltransferase ST3Gal I	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.-	L29555 AAE30612.1 AF059321 AAC17741.1 AAH27866.1 BC027968 AAH36571.1 NM_005688 NP_005688.1	Q11201 Q11207 Q3UN51
α -2,3-sialyltransferase ST3Gal II	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.-	U53090 AAE40389.1 BC056777 X56667 CAA65447.1 NP_005692 NP_005692.1	Q16842 O00654
α -2,3-sialyltransferase ST3Gal III (SIAT6)	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.-	L23768 AAE35778.1 BC050180 AAE26582 AAE26583 AAE26584 AAE26585 AAE26586 AAE26587 AAE26588 AAE26589 AAE26590 AAE26591 AAE26592 AAE26593 AAE26594 AAE26595 AAE26596 AAE26597 AAE26598 AAE26599 AAE26600 AAE26601 AAE26602 AAE26603 AAE26604 AAE26605 AAE26606 AAE26607 AAE26608 AAE26609 AAE26610 AAE26611 AAE26612 AAE26613 AAE26614 AAE26615 AAE26616 AAE26617 AAE26618 AAE26619 AAE26620 AAE26621 AAE26622 AAE26623 AAE26624 AAE26625 AAE26626 AAE26627 AAE26628 AAE26629 AAE26630 AAE26631 AAE26632 AAE26633 AAE26634 AAE26635 AAE26636 AAE26637 AAE26638 AAE26639 AAE26640 AAE26641 AAE26642 AAE26643 AAE26644 AAE26645 AAE26646 AAE26647 AAE26648 AAE26649 AAE26650 AAE26651 AAE26652 AAE26653 AAE26654 AAE26655 AAE26656 AAE26657 AAE26658 AAE26659 AAE26660 AAE26661 AAE26662 AAE26663 AAE26664 AAE26665 AAE26666 AAE26667 AAE26668 AAE26669 AAE26670 AAE26671 AAE26672 AAE26673 AAE26674 AAE26675 AAE26676 AAE26677 AAE26678 AAE26679 AAE26680 AAE26681 AAE26682 AAE26683 AAE26684 AAE26685 AAE26686 AAE26687 AAE26688 AAE26689 AAE26690 AAE26691 AAE26692 AAE26693 AAE26694 AAE26695 AAE26696 AAE26697 AAE26698 AAE26699 AAE266100 AAE266101 AAE266102 AAE266103 AAE266104 AAE266105 AAE266106 AAE266107 AAE266108 AAE266109 AAE266110 AAE266111 AAE266112 AAE266113 AAE266114 AAE266115 AAE266116 AAE266117 AAE266118 AAE266119 AAE266120 AAE266121 AAE266122 AAE266123 AAE266124 AAE266125 AAE266126 AAE266127 AAE266128 AAE266129 AAE266130 AAE266131 AAE266132 AAE266133 AAE266134 AAE266135 AAE266136 AAE266137 AAE266138 AAE266139 AAE266140 AAE266141 AAE266142 AAE266143 AAE266144 AAE266145 AAE266146 AAE266147 AAE266148 AAE266149 AAE266150 AAE266151 AAE266152 AAE266153 AAE266154 AAE266155 AAE266156 AAE266157 AAE266158 AAE266159 AAE266160 AAE266161 AAE266162 AAE266163 AAE266164 AAE266165 AAE266166 AAE266167 AAE266168 AAE266169 AAE266170 AAE266171 AAE266172 AAE266173 AAE266174 AAE266175 AAE266176 AAE266177 AAE266178 AAE266179 AAE266180 AAE266181 AAE266182 AAE266183 AAE266184 AAE266185 AAE266186 AAE266187 AAE266188 AAE266189 AAE266190 AAE266191 AAE266192 AAE266193 AAE266194 AAE266195 AAE266196 AAE266197 AAE266198 AAE266199 AAE266200 AAE266201 AAE266202 AAE266203 AAE266204 AAE266205 AAE266206 AAE266207 AAE266208 AAE266209 AAE266210 AAE266211 AAE266212 AAE266213 AAE266214 AAE266215 AAE266216 AAE266217 AAE266218 AAE266219 AAE266220 AAE266221 AAE266222 AAE266223 AAE266224 AAE266225 AAE266226 AAE266227 AAE266228 AAE266229 AAE266230 AAE266231 AAE266232 AAE266233 AAE266234 AAE266235 AAE266236 AAE266237 AAE266238 AAE266239 AAE266240 AAE266241 AAE266242 AAE266243 AAE266244 AAE266245 AAE266246 AAE266247 AAE266248 AAE266249 AAE266250 AAE266251 AAE266252 AAE266253 AAE266254 AAE266255 AAE266256 AAE266257 AAE266258 AAE266259 AAE266260 AAE266261 AAE266262 AAE266263 AAE266264 AAE266265 AAE266266 AAE266267 AAE266268 AAE266269 AAE266270 AAE266271 AAE266272 AAE266273 AAE266274 AAE266275 AAE266276 AAE266277 AAE266278 AAE266279 AAE266280 AAE266281 AAE266282 AAE266283 AAE266284 AAE266285 AAE266286 AAE266287 AAE266288 AAE266289 AAE266290 AAE266291 AAE266292 AAE266293 AAE266294 AAE266295 AAE266296 AAE266297 AAE266298 AAE266299 AAE266300 AAE266301 AAE266302 AAE266303 AAE266304 AAE266305 AAE266306 AAE266307 AAE266308 AAE266309 AAE266310 AAE266311 AAE266312 AAE266313 AAE266314 AAE266315 AAE266316 AAE266317 AAE266318 AAE266319 AAE266320 AAE266321 AAE266322 AAE266323 AAE266324 AAE266325 AAE266326 AAE266327 AAE266328 AAE266329 AAE266330 AAE266331 AAE266332 AAE266333 AAE266334 AAE266335 AAE266336 AAE266337 AAE266338 AAE266339 AAE266340 AAE266341 AAE266342 AAE266343 AAE266344 AAE266345 AAE266346 AAE266347 AAE266348 AAE266349 AAE266350 AAE266351 AAE266352 AAE266353 AAE266354 AAE266355 AAE266356 AAE266357 AAE266358 AAE266359 AAE266360 AAE266361 AAE266362 AAE266363 AAE266364 AAE266365 AAE266366 AAE266367 AAE266368 AAE266369 AAE266370 AAE266371 AAE266372 AAE266373 AAE266374 AAE266375 AAE266376 AAE266377 AAE266378 AAE266379 AAE266380 AAE266381 AAE266382 AAE266383 AAE266384 AAE266385 AAE266386 AAE266387 AAE266388 AAE266389 AAE266390 AAE266391 AAE266392 AAE266393 AAE266394 AAE266395 AAE266396 AAE266397 AAE266398 AAE266399 AAE266400 AAE266401 AAE266402 AAE266403 AAE266404 AAE266405 AAE266406 AAE266407 AAE266408 AAE266409 AAE266410 AAE266411 AAE266412 AAE266413 AAE266414 AAE266415 AAE266416 AAE266417 AAE266418 AAE266419 AAE266420 AAE266421 AAE266422 AAE266423 AAE266424 AAE266425 AAE266426 AAE266427 AAE266428 AAE266429 AAE266430 AAE266431 AAE266432 AAE266433 AAE266434 AAE266435 AAE266436 AAE266437 AAE266438 AAE266439 AAE266440 AAE266441 AAE266442 AAE266443 AAE266444 AAE266445 AAE266446 AAE266447 AAE266448 AAE266449 AAE266450 AAE266451 AAE266452 AAE266453 AAE266454 AAE266455 AAE266456 AAE266457 AAE266458 AAE266459 AAE266460 AAE266461 AAE266462 AAE266463 AAE266464 AAE266465 AAE266466 AAE266467 AAE266468 AAE266469 AAE266470 AAE266471 AAE266472 AAE266473 AAE266474 AAE266475 AAE266476 AAE266477 AAE266478 AAE266479 AAE266480 AAE266481 AAE266482 AAE266483 AAE266484 AAE266485 AAE266486 AAE266487 AAE266488 AAE266489 AAE266490 AAE266491 AAE266492 AAE266493 AAE266494 AAE266495 AAE266496 AAE266497 AAE266498 AAE266499 AAE266500 AAE266501 AAE266502 AAE266503 AAE266504 AAE266505 AAE266506 AAE266507 AAE266508 AAE266509 AAE266510 AAE266511 AAE266512 AAE266513 AAE266514 AAE266515 AAE266516 AAE266517 AAE266518 AAE266519 AAE266520 AAE266521 AAE266522 AAE266523 AAE266524 AAE266525 AAE266526 AAE266527 AAE266528 AAE266529 AAE266530 AAE266531 AAE266532 AAE266533 AAE266534 AAE266535 AAE266536 AAE266537 AAE266538 AAE266539 AAE266540 AAE266541 AAE266542 AAE266543 AAE266544 AAE266545 AAE266546 AAE266547 AAE266548 AAE266549 AAE266550 AAE266551 AAE266552 AAE266553 AAE266554 AAE266555 AAE266556 AAE266557 AAE266558 AAE266559 AAE266560 AAE266561 AAE266562 AAE266563 AAE266564 AAE266565 AAE266566 AAE266567 AAE266568 AAE266569 AAE266570 AAE266571 AAE266572 AAE266573 AAE266574 AAE266575 AAE266576 AAE266577 AAE266578 AAE266579 AAE266580 AAE266581 AAE266582 AAE266583 AAE266584 AAE266585 AAE266586 AAE266587 AAE266588 AAE266589 AAE266590 AAE266591 AAE266592 AAE266593 AAE266594 AAE266595 AAE266596 AAE266597 AAE266598 AAE266599 AAE2665100 AAE2665101 AAE2665102 AAE2665103 AAE2665104 AAE2665105 AAE2665106 AAE2665107 AAE2665108 AAE2665109 AAE2665110 AAE2665111 AAE2665112 AAE2665113 AAE2665114 AAE2665115 AAE2665116 AAE2665117 AAE2665118 AAE2665119 AAE2665120 AAE2665121 AAE2665122 AAE2665123 AAE2665124 AAE2665125 AAE2665126 AAE2665127 AAE2665128 AAE2665129 AAE2665130 AAE2665131 AAE2665132 AAE2665133 AAE2665134 AAE2665135 AAE2665136 AAE2665137 AAE2665138 AAE2665139 AAE2665140 AAE2665141 AAE2665142 AAE2665143 AAE2665144 AAE2665145 AAE2665146 AAE2665147 AAE2665148 AAE2665149 AAE2665150 AAE2665151 AAE2665152 AAE2665153 AAE2665154 AAE2665155 AAE2665156 AAE2665157 AAE2665158 AAE2665159 AAE2665160 AAE2665161 AAE2665162 AAE2665163 AAE2665164 AAE2665165 AAE2665166 AAE2665167 AAE2665168 AAE2665169 AAE2665170 AAE2665171 AAE2665172 AAE2665173 AAE2665174 AAE2665175 AAE2665176 AAE2665177 AAE2665178 AAE2665179 AAE2665180 AAE2665181 AAE2665182 AAE2665183 AAE2665184 AAE2665185 AAE2665186 AAE2665187 AAE2665188 AAE2665189 AAE2665190 AAE2665191 AAE2665192 AAE2665193 AAE2665194 AAE2665195 AAE2665196 AAE2665197 AAE2665198 AAE2665199 AAE2665200 AAE2665201 AAE2665202 AAE2665203 AAE2665204 AAE2665205 AAE2665206 AAE2665207 AAE2665208 AAE2665209 AAE2665210 AAE2665211 AAE2665212 AAE2665213 AAE2665214 AAE2665215 AAE2665216 AAE2665217 AAE2665218 AAE2665219 AAE2665220 AAE2665221 AAE2665222 AAE2665223 AAE2665224 AAE2665225 AAE2665226 AAE2665227 AAE2665228 AAE2665229 AAE2665230 AAE2665231 AAE2665232 AAE2665233 AAE2665234 AAE2665235 AAE2665236 AAE2665237 AAE2665238 AAE2665239 AAE2665240 AAE2665241 AAE2665242 AAE2665243 AAE2665244 AAE2665245 AAE2665246 AAE2665247 AAE2665248 AAE2665249 AAE2665250 AAE2665251 AAE2665252 AAE2665253 AAE2665254 AAE2665255 AAE2665256 AAE2665257 AAE2665258 AAE2665259 AAE2665260 AAE2665261 AAE2665262 AAE2665263 AAE2665264 AAE2665265 AAE2665266 AAE2665267 AAE2665268 AAE2665269 AAE2665270 AAE2665271 AAE2665272 AAE2665273 AAE2665274 AAE2665275 AAE2665276 AAE2665277 AAE2665278 AAE2665279 AAE2665280 AAE2665281 AAE2665282 AAE2665283 AAE2665284 AAE2665285 AAE2665286 AAE2665287 AAE2665288 AAE2665289 AAE2665290 AAE2665291 AAE2665292 AAE2665293 AAE2665294 AAE2665295 AAE2665296 AAE2665297 AAE2665298 AAE2665299 AAE2665300 AAE2665301 AAE2665302 AAE2665303 AAE2665304 AAE2665305 AAE2665306 AAE2665307 AAE2665308 AAE2665309 AAE2665310 AAE2665311 AAE2665312 AAE2665313 AAE2665314 AAE2665315 AAE2665316 AAE2665317 AAE2665318 AAE2665319 AAE2665320 AAE2665321 AAE2665322 AAE2665323 AAE2665324 AAE2665325 AAE2665326 AAE2665327 AAE2665328 AAE2665329 AAE2665330 AAE2665331 AAE2665332 AAE2665333 AAE2665334 AAE2665335 AAE2665336 AAE2665337 AAE2665338 AAE2665339 AAE2665340 AAE2665341 AAE2665342 AAE2665343 AAE2665344 AAE2665345 AAE2665346 AAE2665347 AAE2665348 AAE2665349 AAE2665350 AAE2665351 AAE2665352 AAE2665353 AAE2665354 AAE2665355 AAE2665356 AAE2665357 AAE2665358 AAE2665359 AAE2665360 AAE2665361 AAE2665362 AAE2665363 AAE2665364 AAE2665365 AAE2665366 AAE2665367 AAE2665368 AAE2665369 AAE2665370 AAE2665371 AAE2665372 AAE2665373 AAE2665374 AAE2665375 AAE2665376 AAE2665377 AAE2665378 AAE2665379 AAE2665380 AAE2665381 AAE2665382 AAE2665383 AAE2665384 AAE2665385 AAE2665386 AAE2665387 AAE2665388 AAE2665389 AAE2665390 AAE2665391 AAE2665392 AAE2665393 AAE2665394 AAE2665395 AAE2665396 AAE2665397 AAE2665398 AAE2665399 AAE26	

【図7G】

【図7H】

FIGURE 7G

タンパク質	生物	EC#	GenBank / GenPept	SwissProt / PDB / 3D
α,2,6-sialyltransferase (ST6GalNAc IV)	<i>Mus musculus</i>	2.4.99.7	NC_011377.1 NP_035502.1 BC051451 AAH86451.1 AK085790 BAC95231.1 AJ070310 AAU07446.1 Y15779 CAB43507.1 Y15780 CAB43514.1 Y19058 CAB93946.1 Y19057 CAB93948.1	Q8CSJ2 Q9JHP2 Q9RB26 Q88725 Q8J1P0 Q8QUP9 Q8RB25 NP_035503.1
α,2,6-sialyltransferase (GD3 synthase) ST6Sia	<i>Mus musculus</i>	2.4.99.8	LS8877.1 NP_035504.1 BC051452 AAH86452.1 AK061324 BAC95251.1 AK052444 BAC94964.1 X43235 CAB90141.1 AJ401102 CAB20706.1 NM_011374 NP_035504.1	Q84466 Q8J497 Q8B176 Q8WV10 Q8K1C1 Q8EPK0
α,2,6-sialyltransferase (ST6Sia VI)	<i>Mus musculus</i>	n.d.	AB058554 CAB01265.1 AK085106 BAC93671.1 NM_145838 D6E5587.1	Q8B143 Q8K4T1
α,2,6-sialyltransferase ST6Sia II	<i>Mus musculus</i>	2.4.99.	X38562 CAB58458.1 X99546 AAU67965.1 X99647 AAU67965.1 X99548 AAU67965.1 X99550 AAU67965.1 X99651 AAU67965.1	Q86696
α,2,6-sialyltransferase ST6Sia IV	<i>Mus musculus</i>	2.4.98.9	BC060112 AAH80112.1 AK030690 BAC28441.1 AK041723 BAC10441.1 AJ223955 CAB11665.1 X86900 CAB53992.1 Y09484 CAB70892.1 NM_009183 NP_032029.1	Q84892 Q8BY70
α,2,6-sialyltransferase ST6Sia V	<i>Mus musculus</i>	2.4.99.	BC060155 CAB11665.1 AK030691 BAC273541.1 X98014 CAB66431.1 X98014 CAB66441.1 X98014 CAB66441.1 NM_013665 NP_038694.1 NM_151214 NP_047476.1 NM_177417 NP_803135.1	P70126 P70127 P70128 Q8BJW0 Q8JZQ3
α,2,6-sialyltransferase ST6Sia III	<i>Mus musculus</i>	2.4.99.	BC076545 AAH75645.1 AK015974 BAC80012.1 X80502 CAB56651.1 NM_009162 NP_032026.1	Q64689 Q8CUJ6
GD1 synthase (ST6GalNAc V)	<i>Mus musculus</i>	n.d.	BC057537 AAH75647.1 AK028050 BAC273547.1 AK028050 BAC80023.1 AK028437 CAB28823.1 AK024683 CAB29937.1 AK024683 CAB13311.1 NM_012028 NP_036158.2	Q8CM7 Q8CX1 Q8QYU1 Q8P0K6
GM3 synthase (α,2,3-sialyltransferase) ST3Gal V	<i>Mus musculus</i>	2.4.99.9	AF119418 PAB65147.1 AB018048 PAB65063.1 AB013302 BAC133491.1 AK012961 BAC28571.1 Y15030 CAB75235.1 NM_011375 NP_035505.1	Q88829 Q9CZ65 Q9QWF9
N-acetylgalactosaminidase (α,2,6-sialyltransferase) ST6GalAc VI	<i>Mus musculus</i>	2.4.99.	BC038985 AAH36985.1 AB013302 BAC133491.1 AB035123 BAC95940.1 AK030648 CAB27094.1	Q8CDC3 Q8ZW3 Q9JW65 Q9RG09

【図7】

【図7】

FIGURE 7I

タンパク質	生物	EC#	GenBank / GenPept	SwissProt / PDB / 3D
α -2,3-sialyltransferase (ST6Gal I)	Pan troglodytes	n.d.	AJ697663	CAG26901.1
α -2,6-sialyltransferase (ST6Gal II)	Pan troglodytes	2.4.99.1	AJ627824	CAF29492.1
β -galactosaminide α -2,6-sialyltransferase I (ST6Gal I; Sialt)	Pan troglodytes	n.d.	AJ627305	CAF29493.1
β -galactosaminide α -2,6-sialyltransferase II (ST6Gal II)	Pan troglodytes	n.d.	AJ744807	CAG32843.1
GM3 synthase ST3Gal V (Sialt)	Rabbit fibroma virus Kacza	n.d.	NC_001268	NP_052025
ST3Gal I	Rattus norvegicus	2.4.99.1	M87754	AAA42146.1
ST3Gal II	Rattus norvegicus	2.4.99.1	NM_031667	NP_113885.1
ST3Gal III	Rattus norvegicus	n.d.	AJ626925	CAF26183.1
ST3Gal IV (Sialt4c)	Rattus norvegicus	n.d.	AJ626743	CAP26053.1
ST3Gal V	Rattus norvegicus	2.4.99.1	X76983	CA545293.1
ST3Gal VI	Rattus norvegicus	n.d.	NP_031695	NP_113885.1
ST3Gal VII	Rattus norvegicus	2.4.99.1	M18769	AAA41196.1
ST6Gal I	Rattus norvegicus	n.d.	MS3143	AAH9233.1
ST6Gal II	Rattus norvegicus	n.d.	AJ634456	CAG25664.1
ST6Gal III (Sialt7A)	Rattus norvegicus	n.d.	AJ634457	CAG25677.1
ST6Gal IV (Sialt7B)	Rattus norvegicus	2.4.99.1	LC29554	AAC42066.1
ST6Gal V (Sialt7C)	Rattus norvegicus	2.4.99.1	BC072501	AAH72501.1
ST6Gal NAc III	Rattus norvegicus	2.4.99.1	NM_019123	NP_061996.1
ST6Gal NAc IV (SialtD) (fragment)	Rattus norvegicus	n.d.	AJ646871	CAG26700.1
ST6Gal NAc V (SialtE)	Rattus norvegicus	n.d.	AJ646872	CAG26701.1
ST6Gal NAc VI (SialtF) (fragment)	Rattus norvegicus	n.d.	AJ646881	CAG26710.1
ST6Gal NAc VII (SialtG) (S3H synthase) ST8Sia	Rattus norvegicus	2.4.99.1	U59883	AAC27541.1
ST6Gal NAc VIII (SialtH)	Rattus norvegicus	n.d.	D45255	BA008213.1
ST6Gal NAc IX (SialtI)	Rattus norvegicus	n.d.	AJ699422	CAG27884.1
ST6Gal NAc X (SialtJ)	Rattus norvegicus	n.d.	AJ699423	CAG27885.1
ST6Gal NAc XI (SialtK)	Rattus norvegicus	2.4.99.1	L13445	AAA42147.1
ST6Gal NAc XII (SialtL)	Rattus norvegicus	2.4.99.1	NM_071558	NP_476497.1
ST6Gal NAc XIII (SialtM)	Rattus norvegicus	2.4.99.1	U59883	AAC28006.1
ST6Gal NAc XIV (SialtN)	Rattus norvegicus	n.d.	NM_013023	NP_037161.1
ST6Gal NAc XV (SialtO)	Rattus norvegicus	2.4.99.1	U90215	AAU49989.1
ST6Gal NAc XVI (SialtP)	Rattus norvegicus	n.d.	AJ627626	CAF29494.1
ST6Gal NAc XVII (SialtQ)	Rattus norvegicus	n.d.	AB018049	BAE33492.1
ST6Gal NAc XVIII (SialtR)	Rattus norvegicus	n.d.	AB013337	NP_112627.1
GM3 synthase ST3Gal V	Rattus norvegicus	n.d.		O88830

FIGURE 7H

タンパク質	生物	EC#	GenBank / GenPept	SwissProt	PD / 3
			NM_016973(NP_056559.1)		
M138L	Myxoma virus	n.d.	UH8578 AF170726 NC_001132	AA000009 AAE1323.1 AAE1328.1 AAF15026.1 NP_051852.1	
α -2,3-sialyltransferase (ST3Gal-I)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	n.d.	AJ858780	CAE1384.1	
α -2,6-sialyltransferase (ST6)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	n.d.	AJ620649	CAP05648.1	
α -2,8-polygalactosyltransferase IV (ST8Gal IV)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	n.d.	AB094402	BAC77411.1	Q7T2X5
GalNAc α -2,6-sialyltransferase (ST6GalNAc)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	n.d.	AB097943	BAC77520.1	Q7T2X4
α -2,3-sialyltransferase ST3Gal IV	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	2.4.99..	AF121967	AAF26871.1	Q8N257
OJ1217_F02.7	<i>Oryza sativa</i> (Japonica cultivar-group)	n.d.	AP004084	BAD07616.1	
OSJNB000243L24.2 or OSJNB000211.9	<i>Oryza sativa</i> (Japonica cultivar-group)	n.d.	AL731266 AL629699	CAD4186.1 CDAE0741.1	
P0683f02.18 or P0469pB03.1	<i>Oryza sativa</i> (Japonica cultivar-group)	n.d.	AP003286 AP003784	BAB63715.1 BAB90532.1	
α -2,6-sialyltransferase ST6GalNAc V (SiatE) (fragment)	<i>Oryzias latipes</i>	n.d.	AJ648676	CAG26705.1	
α -2,3-sialyltransferase ST3Gal I (Siat)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ744803	CAG32839.1	
α -2,3-sialyltransferase ST3Gal II (Siat)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ744804	CAG32840.1	
α -2,3-sialyltransferase ST3Gal III (Siat)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ626819	CAF25177.1	
α -2,3-sialyltransferase ST3Gal IV (Siat4c)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ626824	CAF25182.1	
α -2,3-sialyltransferase ST3Gal VI (Siat10)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ744908	CAG32844.1	
α -2,3-sialyltransferase (Siat7A)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ748740	CAG38615.1	
α -2,6-sialyltransferase (Siat7B)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ748741	CAG38616.1	
α -2,6-sialyltransferase ST6GalNAc II (Siat7C)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ634454	CAG25676.1	
α -2,6-sialyltransferase ST6GalNAc IV (Siat7D) (fragment)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ646870	CAG26699.1	
α -2,6-sialyltransferase ST6GalNAc V (SiatE)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ648675	CAG28704.1	
α -2,6-sialyltransferase ST6GalNAc VI (SiatF) (fragment)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ646882	CAG26711.1	
α -2,8-sialyltransferase 8A (SiatA)	<i>Pan troglodytes</i>	2.4.99.5	AJ697685	CAG26896.1	
α -2,8-sialyltransferase 8B (SiatB)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ697659	CAG26897.1	
α -2,8-sialyltransferase 8C (SiatC)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ697660	CAG26898.1	
α -2,8-sialyltransferase 8D (SiatD)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ697661	CAG26899.1	
α -2,8-sialyltransferase	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ697662	CAG26900.1	

FIGURE 7J

2

タンパク質	生物	EC#	GenBank/GenPept	SwissProt(PD/3D)
α,1-sialyltransferase	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ748840	CA644448.1
ST3Gal-I (Slat4)				
α,2,3-sialyltransferase	<i>Silurana tropicalis</i>	n.d.	AJ585763	CAE51387.1
(ST3Gal-II)				
α,2,6-sialyltransferase	<i>Silurana tropicalis</i>	n.d.	AJ620650	CAF05849.1
(Slat7)				
α,2,6-sialyltransferase	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	n.d.	AJ695425	CA627887.1
(ST6Galnac)				
α,2,3-sialyltransferase	<i>Sus scrofa</i>	n.d.	AJ585765	CAE51389.1
(ST3Gal-III)				
α,2,3-sialyltransferase	<i>Sus scrofa</i>	n.d.	AJ584674	CAE48299.1
(ST3Gal-IV)				
α,2,3-sialyltransferase	<i>Sus scrofa</i>	2,4,99.4	M97753	AAA81125.1
ST3Gal I				Q02745
α,2,6-sialyltransferase	<i>Sus scrofa</i>	2,4,99.1	AF136746	AAD30959.1
(fragment) ST6GalI				Q9XSG8
β-galactosamide- α ,2,6-sialyltransferase	<i>Sus scrofa</i>	n.d.	AJ520348	CAF05852.5
(ST6GalNAc-2v)				
sialyltransferase	<i>Sus scrofa</i>	n.d.	AF041031	AAC15633.1
(fragment) ST6GalNAc I				O62717
ST6GalNAc-V				
sialyltransferase	<i>Sus scrofa</i>	n.d.	AJ620948	CAF06585.1
(fragment) ST6GalNAc-V				
sialyltransferase	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ626816	CAP25174.1
ST3Gal I (Slat4)				
α,2-sialyltransferase	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ626817	CAP25175.1
ST3Gal II (Slat5)				
α,2-sialyltransferase	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ626818	CAP25176.1
(fragment)				
α,2-sialyltransferase	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ626818	CAP25176.1
ST3Gal III (Slat5)				
α,2-sialyltransferase	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ744809	CAG32836.1
ST6Gal I (Slat1)				
α,2,6-sialyltransferase	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ634460	CAG25681.1
ST6GalNAc II (Slat3B)				
α,2,6-sialyltransferase	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ634461	CAG25682.1
ST6GalNAc II B (Slat3B-related)				
α,2-sialyltransferase	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ634456	CAG25678.1
ST6GalNAc III (Slat7C)				
α,2,6-sialyltransferase	<i>Takifugu rubripes</i>	2,4,99.3	Y17466	CAB44338.1
ST6GalNAc IV (slat7D)			AJ648689	CAG25698.1
(fragment)				Q9W6U6
α,2,6-sialyltransferase	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ648673	CAG26702.1
ST6GalNAc V (Slat7E)				
(fragment)				
α,2,6-sialyltransferase	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ646880	CAG26709.1
ST6GalNAc VI (Slat7F)				
(fragment)				
α,2,6-sialyltransferase	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ715534	CAG29373.1
ST8Sia I (Slat9A)				
(fragment)				
α,2,6-sialyltransferase	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ715536	CAG29377.1
ST8Sia II (Slat8B)				
(fragment)				
α,2,6-sialyltransferase	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ715541	CAG29380.1
ST8Sia III (Slat8C)				
(fragment)				
α,2,6-sialyltransferase	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ715542	CAG29381.1
ST8Sia IV (Slat8C)				
α,2,6-sialyltransferase	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ715547	CAG29385.1

【図7K】

FIGURE 7K

タンパク質	生物	EC#	GenBank / GenPept	SwissProt / PDB / 3D
(fragment)				
α -2,3-sialyltransferase ST8Sia VI (Stat 8F) (fragment)	Takifugu rubripes	n.d.	AJ715549	CAG29388.1
α -2,3-sialyltransferase ST8Sia VI (Stat 8F)	Takifugu rubripes	n.d.	AJ715550	CAG29389.1
α -2,3-sialyltransferase ST8Sia VI (Stat 8F)	Tetraodon nigroviridis	n.d.	AJ744806	CAG32842.1
α -2,3-sialyltransferase ST8Sia VI (Stat 8F)	Tetraodon nigroviridis	n.d.	AJ744802	CAG32838.1
α -2,3-sialyltransferase ST3Gal I (Stat4)	Tetraodon nigroviridis	n.d.	AJ626822	CAP25180.1
α -2,3-sialyltransferase ST3Gal III (Stat6)	Tetraodon nigroviridis	n.d.	AJ634462	CAG26683.1
α -2,3-sialyltransferase ST6GalNAc II (Stat7B) (fragment)	Tetraodon nigroviridis	n.d.	AJ646879	CAG26708.1
α -2,3-sialyltransferase ST6GalNAc V (Stat7E) (fragment)	Tetraodon nigroviridis	n.d.	AJ715536	CAG29375.1
α -2,3-sialyltransferase ST8Sia I (Stat 8A) (fragment)	Tetraodon nigroviridis	n.d.	AJ715537	CAG29376.1
α -2,3-sialyltransferase ST8Sia II (Stat 8B) (fragment)	Tetraodon nigroviridis	n.d.	AJ715539	CAG29378.1
α -2,3-sialyltransferase ST8Sia III (Stat 8C) (fragment)	Tetraodon nigroviridis	n.d.	AJ715540	CAG29379.1
α -2,3-sialyltransferase ST8Sia III (Stat 8C) (fragment)	Tetraodon nigroviridis	n.d.	AJ715548	CAG29387.1
α -2,3-sialyltransferase ST8Sia V (Stat 8E) (fragment)	Xenopus laevis	n.d.	AJ585762	CAE51386.1
α -2,3-sialyltransferase ST8Sia VI (Stat 8F) (fragment)	Xenopus laevis	n.d.	AJ585766	CAE51389.1
α -2,3-sialyltransferase ST3Gal-IV (Sialo-IV)	Xenopus laevis	n.d.	AJ585764	CAE51388.1
α -2,3-sialyltransferase ST3Gal-IV (Sialo-IV)	Xenopus laevis	n.d.	AJ626823	CAF25181.1
α -2,3-sialyltransferase ST6Gal-III (Sialo-III)	Xenopus laevis	2.4.99.-	A9007468	BAA32617.1
Unknown protein for MGCI-81265	Xenopus laevis	n.d.	BC008760	AAT68760.1
α -2,3-sialyltransferase ST6Gal-IV (Sialo-IV)	Xenopus tropicalis	n.d.	AJ626744	CAF25054.1
α -2,3-sialyltransferase ST6Gal-IV (Sialo-IV)	Xenopus tropicalis	n.d.	AJ622908	CAF22058.1
α -2,3-sialyltransferase ST6Gal-IV (Sialo-IV)	Xenopus tropicalis	n.d.	AJ646870	CAG26707.1
α -2,3-sialyltransferase ST8Sia V (Stat 8C) (fragment)	Xenopus tropicalis	n.d.	AJ715544	CAG29383.1
α -2,3-sialyltransferase ST8Sia VI (Stat 8C) (fragment)	Xenopus tropicalis	n.d.	AJ626728	CAF29496.1
α -2,6-sialyltransferase II (ST6Gal-I)	Xenopus tropicalis	n.d.	AY652775	AAT67042
sialyltransferase ST6Gal-I	Xenopus tropicalis	2.4.-.	M78370	AAA24213.1
poly- α -2,8-sialoyl sialyltransferase (NeuS)	Escherichia coli K1	2.4.-.	X65098	CAA43053.1
polysialyltransferase	Escherichia coli K2	2.4.-.	M88479	AAA24215.1
				Q47404

【図7L】

FIGURE 7L

タンパク質	生物	EC#	GenBank / GenPept	SwissProt / PDB / 3D
α -2,8-sialyltransferase ST6	Neisseria meningitidis B1940	2.4.-.	M96053	AAA20478.1
ST6	Neisseria meningitidis	n.d.	X78058	Q51145
ST6	Neisseria meningitidis FAM18	n.d.	U75650	AA853842.1
polysialyltransferase ST6(fragment)	Neisseria meningitidis M1019	n.d.	AY234192	AA085290.1
ST6(fragment)	Neisseria meningitidis M209	n.d.	AY281046	AAP34769.1
ST6(fragment)	Neisseria meningitidis M3045	n.d.	AY281044	AAP34767.1
polysialyltransferase ST6(fragment)	Neisseria meningitidis M3315	n.d.	AY234191	AA085289.1
ST6(fragment)	Neisseria meningitidis M5175	n.d.	AY281047	AAP34770.1
polysialyltransferase ST6(fragment)	Neisseria meningitidis M4211	n.d.	AY234190	AA085288.1
ST6(fragment)	Neisseria meningitidis M4642	n.d.	AY281048	AAP34771.1
polysialyltransferase ST6(fragment)	Neisseria meningitidis M5177	n.d.	AY234193	AA085291.1
ST6	Neisseria meningitidis M5178	n.d.	AY281043	AAP34768.1
ST6(D fragment)	Neisseria meningitidis M890	n.d.	AY281045	AAP34768.1
NMB0057	Neisseria meningitidis MC58	n.d.	NC_003112	NP_273131
Lst	Aeromonas punctata Sch3	n.d.	AF126256	AAS6624.1
ORF2	Haemophilus influenzae A2	n.d.	M84655	AAA24979.1
HII693	Haemophilus influenzae Rd	n.d.	US2842	AAC23345.1
			NC_000807	NP_438941.1
α -2,3-sialyltransferase	Neisseria gonorrhoeae F62	2.4.99.4	U80664	AA44538.1
α -2,3-sialyltransferase	Neisseria meningitidis 128E, NRCC 4010	2.4.99.4	U80662	AA44544.2
α -2,3-sialyltransferase	Neisseria meningitidis 406V, NRCC 4030	2.4.99.4	U80661	AA44543.1
α -2,3-sialyltransferase (NM30922)	Neisseria meningitidis MC58	2.4.99.4	U80660	AA044641.1
			AE002443	AAF41330.1
			NC_003112	NP_273952.1
NMA1118	Neisseria meningitidis Z2491	n.d.	AL162755	CAB84380.1
			NC_003116	NP_293887.1
PM0508	Pasteurella multocida PM70	n.d.	AE006088	AAK02692.1
WaaH	Salmonella enterica SAR225	n.d.	AF519767	AAM82550.1
WaaH	Salmonella enterica SAR226	n.d.	AF519788	AAM82551.1
WaaH	Salmonella enterica SAR239	n.d.	AF519789	AAM82552.1
WaaH	Salmonella enterica SAR253	n.d.	AF519790	AAM82553.1
WaaH	Salmonella enterica SAR253	n.d.	AF519791	AAM82554.1
WaaH	Salmonella enterica SAR257	n.d.	AF519793	AAM82556.1
WaaH	Salmonella enterica SAR271	n.d.	AF519792	AAM82555.1

【図7M】

FIGURE 7M

タンパク質	生物	EC#	GenBank / GenPept	SwissProt / PDB / 3D
Sarcosine	SARC09			
WaaH	Salmonella enterica SARC10V	n.d.	AF519779	AAM88401.1
WaaH (fragment)	Salmonella enterica SARC12	n.d.	AF519781	AAM88424.1
WaaH (fragment)	Salmonella enterica SARC13I	n.d.	AF519782	AAM88431.1
WaaH (fragment)	Salmonella enterica SARC14I	n.d.	AF519783	AAM88441.1
WaaH	Salmonella enterica SARC15II	n.d.	AF519784	AAM88451.1
WaaH	Salmonella enterica SARC16II	n.d.	AF519785	AAM88451.1
WaaH (fragment)	Salmonella enterica SARC3I	n.d.	AF519772	AAM88341.1
WaaH (fragment)	Salmonella enterica SARC4II	n.d.	AF519773	AAM88351.1
WaaH	Salmonella enterica SARC5II	n.d.	AF519774	AAM88363.1
WaaH	Salmonella enterica SARC6II	n.d.	AF519775	AAM88371.1
WaaH	Salmonella enterica SARC8II	n.d.	AF519777	AAM88383.1
WaaH	Salmonella enterica SARC9V	n.d.	AF519778	AAM88391.1
UDP-glucose : α -1,2-sialyltransferase (WaaH)	Salmonella enterica subsp. arizonae SARC9	2.4.1.-	AF511116	AAM48166.1
bi-functional α -2,3- β -2,6-sialyltransferase (Cst-II)	Campylobacter jejuni ATCC 43449	n.d.	AF401529	AAL06004.1
Cst	Campylobacter jejuni ATCC 43429	n.d.	AF305571	AAL09368.1
α -2,3-sialyltransferase (Cst-III)	Campylobacter jejuni ATCC 43429	2.4.99.-	AY044166	AAK73183.1
α -2,3-sialyltransferase (Cst-III)	Campylobacter jejuni ATCC 43430	2.4.99.-	AF400467	AAK85419.1
α -2,3-sialyltransferase (Cst-III)	Campylobacter jejuni ATCC 43432	2.4.99.-	AF215659	AAG43979.1
α -2,3-sialyltransferase (Cst-III)	Campylobacter jejuni ATCC 43438	2.4.99.-	AF400468	AAC91725.1
α -2,3-sialyltransferase (Cst-III)	Campylobacter jejuni ATCC 43446	2.4.99.-	AF167344	AFA34137.1
α -2,3-sialyltransferase (Cst-III)	Campylobacter jejuni ATCC 43456	2.4.99.-	AF401528	AAL05990.1
α -2,3-sialyltransferase (Cst-III)	Campylobacter jejuni ATCC 43460	2.4.99.-	AY044968	AAK96001.1
α -2,3-sialyltransferase (Cst-III)	Campylobacter jejuni ATCC 700297	n.d.	AF216647	AAL36482.1
ORF	Campylobacter jejuni GB11	n.d.	AY422197	AAR82875.1
α -2,3-sialyltransferase (Cst-III)	Campylobacter jejuni MSC57360	2.4.99.-	AF195055	AAC29922.1
α -2,3-sialyltransferase (Cst-III)	Campylobacter jejuni NCTC 11168	2.4.99.-	AL19077	CAB73951.1
α -2,3-sialyltransferase (Cst-III)	Campylobacter jejuni NCTC 11168	n.d.	NC_002163	NP_282268.1
α -2,3-sialyltransferase (Cst-III)	Campylobacter jejuni O:10	n.d.	AA096691	CAA40567.1
α -2,3-sialyltransferase (Cst-III)	Campylobacter jejuni O:19	n.d.	AX934431	CAF04169.1
α -2,3-sialyltransferase (Cst-III)	Campylobacter jejuni O:36	n.d.	AX934438	CAF04171.1
α -2,3-sialyltransferase (Cst-III)	Campylobacter	n.d.	AX934434	CAF04170.1

【図7N】

FIGURE 7N

タンパク質	生物	EC#	GenBank / GenPept	SwissProt / PDB / 3D
jejuni O:4				
α -2,3- β -2,6-sialyltransferase II (Cst-II)	Campylobacter jejuni O:4	n.d.		
Cst	Campylobacter jejuni O:4	n.d.		
α -2,3-sialyltransferase II (Cst-II)	Campylobacter jejuni OH4384	2.4.99.-	AF130466	AAF13495.1
Cst	Campylobacter jejuni OH4384	2.4.99.-	AF130984	AAF13771.1
α -2,3-sialyltransferase II (Cst-II)	Campylobacter jejuni OH4384	n.d.	U92720	AAC22013.1
			X57315	CAA40567.1
			NC_000907	NP_438516.1
PM174	Pasteurella multocida PM70	n.d.	AE006157	AAK03285.1
Sequence 10 from patent US 6503744	Unknown	n.d.	-	AAQ96672.1
Sequence 12 from patent US 6503745	Unknown	n.d.	-	AAT17959.1
Sequence 2 from patent US 6503744	Unknown	n.d.	-	AAT17970.1
Sequence 3 from patent US 6503744	Unknown	n.d.	-	AAT23232.1
Sequence 3 from patent US 6503744	Unknown	n.d.	-	AAQ96668.1
Sequence 3 from patent US 6503744	Unknown	n.d.	-	AAT17665.1
Sequence 34 from patent US 6503744	Unknown	n.d.	-	AAQ96684.1
Sequence 35 from patent US 6503744	Unknown	n.d.	-	AAQ96685.1
Sequence 48 from patent US 6503744	Unknown	n.d.	-	AAT17988.1
Sequence 5 from patent US 6503744	Unknown	n.d.	-	AAT17966.1
Sequence 9 from patent US 6503744	Unknown	n.d.	-	AAQ96671.1

【配列表】

0004951527000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I
A 6 1 P 9/04 (2006.01)	A 6 1 P 9/04
A 6 1 P 7/00 (2006.01)	A 6 1 P 7/00
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A

(31)優先権主張番号 60/674,199
 (32)優先日 平成17年4月22日(2005.4.22)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 60/684,851
 (32)優先日 平成17年5月25日(2005.5.25)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 11/166,404
 (32)優先日 平成17年6月23日(2005.6.23)
 (33)優先権主張国 米国(US)

(72)発明者 ゾフ, デービッド, エー.
 アメリカ合衆国, ペンシルバニア州 19087, ウェーン, ビーチツリー レーン 560
 (72)発明者 ボウェ, キャリン
 アメリカ合衆国, ペンシルバニア州 18901, ドイルスタウン, チェリー レーン 276
 (72)発明者 トウテ, スザン
 アメリカ合衆国, ペンシルバニア州 19454, ペンスバーグ, イースト バック ロード 3
 374
 (72)発明者 フェロ,マイケル
 アメリカ合衆国, ペンシルバニア州 19083, ヘイバータウン, ガーフィールド アベニュー
 1110
 (72)発明者 ウィレット, ウォルター, エス.
 アメリカ合衆国, ペンシルバニア州 18901, ドイルスタウン, コムリー サークル 382
 0

審査官 松田 芳子

(56)参考文献 特表2007-513189(JP, A)
 国際公開第2003/031464(WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 C07K 14/00